



**Ana Margarida Machado Aires**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Biodispositivos Electrónicos  
implantáveis e biodegradáveis:  
nano/microfibras de poli ( $\epsilon$ -  
caprolactona) (PCL)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Isabel Ferreira, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL

Co-orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutor José Luís Constantino Ferreira

Vogais: Prof. Doutora Isabel Maria das Mercês Ferreira

Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Dezembro 2012**



**Ana Margarida Machado Aires**

Licenciatura em Engenharia Biomédica

**Biodispositivos Electrónicos  
implantáveis e biodegradáveis:  
nano/microfibras de poli ( $\epsilon$ -  
caprolactona) (PCL)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Biomédica

Orientador: Isabel Ferreira, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL

Co-orientador: João Paulo Borges, Professor Auxiliar, DCM – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutor José Luís Constantino Ferreira

Vogais: Prof. Doutora Isabel Maria das Mercês Ferreira

Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges



**FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**Dezembro 2012**

## Biodispositivos Electrónicos implantáveis e biodegradáveis: nano/microfibras de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

©2012 - Todos os direitos reservados. Ana Margarida Machado Aires. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

# Agradecimentos

---

Pretendo deixar umas palavras de apreço como sinal de reconhecimento às diversas pessoas que me ajudaram e contribuíram, de forma directa ou indirecta, para a realização deste trabalho de investigação. Isto porque qualquer que seja o projecto científico em que estejamos envolvidos persiste sempre a necessidade de diversas colaborações e de todo um trabalho de equipa.

Aos meus orientadores, Professora Isabel Ferreira e Professor João Paulo Borges, pela possibilidade de me terem concedido a envolvimento neste projecto com contornos já bem definidos por duas grandes Mestres (Ana Baptista e Joana Neto) e por todo o incansável apoio, empenho, incentivo e disponibilidade de partilha de conhecimentos que me prestaram durante a realização do trabalho.

À Mestre Ana Baptista, um agradecimento *Muito Especial* por todos os ensinamentos e conselhos prestados, às longas horas dispensadas e também à paciência mostrada até ao último dia, foram fundamentais para a realização do trabalho.

Aos grupos quer do DCM quer do Cenimat/I3N, onde se realizou todo o trabalho, agradeço a disponibilidade quer dos equipamentos quer dos laboratórios, assim como o espírito de entreajuda de todos os colegas que de alguma forma me ajudaram.

À colega Ana Carina Manjua, um *Muito Obrigada*, pela prontidão com que se disponibilizou a ajudar sempre que surgiram dificuldades, e vice-versa. Assim como à Joana Neto pelas dicas dadas sempre que nos encontrávamos e discutíamos os resultados do nosso “amigo” PCL.

Com um papel indispensável na minha vida, agradeço aos meus Pais, Mana e Avós, devo-lhes tudo o que sou hoje. *Obrigado* por todo o apoio e amor que me têm dado.

Por último, e com muito carinho, agradeço ao Nuno, pelo amor, paciência, compreensão e motivação para enfrentar esta etapa da minha vida.

# Resumo

---

O objectivo do presente trabalho consiste na produção e caracterização de nano/micro fibras de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) por electrofiação com o objectivo de determinar o seu potencial de aplicação em biodispositivos electrónicos que geram energia quando em contacto com fluidos biológicos, como o sangue ou o suor. Assim, as fibras a produzir devem apresentar características de biocompatibilidade e biodegradabilidade para que após o desempenho das suas funções o biodispositivo seja totalmente absorvido pelo corpo humano sem nele causar reacções adversas.

A primeira parte da investigação incidiu sobre a produção de matrizes de nanofibras de policaprolactona, através da técnica de electrofiação que permite a obtenção de membranas cuja estrutura apresenta porosidade, flexibilidade e elevada área superficial. Posteriormente, o estudo focou-se na degradabilidade destas membranas em contacto com biofluidos simulados, de forma a avaliar a sua perda de massa ao longo do tempo.

Foram também realizados estudos de voltametria cíclica para determinar a reactividade electroquímica das membranas produzidas em diferentes meios simulados, através dos quais se observou que as membranas de PCL apresentam um desempenho que depende do tempo de imersão em fluidos biológicos simulados, da espessura da membrana assim como dos materiais empregues na formação dos eléctrodos.

Por último desenvolveu-se um protótipo deste biodispositivo e apresenta-se o seu desempenho quando imerso em soro fisiológico, sendo avaliada sua aplicabilidade em dispositivos médicos electrónicos de baixo consumo energético.

**Palavras-chave:** Biodispositivo; Policaprolactona; Electrofiação; Fluidos Biológicos simulados; Voltametria Cíclica.

# Abstract

---

The aim of this work is the production and characterization of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) nano/micro-fibers by electrospinning in an attempt to assess their potential application in electronic biodevices that can produce energy when in contact with biological fluids such as blood or sweat. As a result, these fibers have necessarily to be biocompatible and biodegradable so that, after performing their functions, the biodevice could be fully absorbed by the human body without causing adverse reactions.

This study is focused on the production of polycaprolactone nanofiber matrices via electrospinning. The resulting membranes display a porous and a flexible structure which has a high surface area. This research consisted on the study of the degradability of these membranes in contact with simulated biofluids so that was possible to evaluate their mass loss over the time.

Cyclic voltammetry studies have also been carried out in order to determine the electrochemical reactivity of the membranes produced in different settings. Results showed that the performance of the PCL membranes is directly dependent on three factors: the time of immersion in biological fluids, the thickness of the membrane and also the materials which were used in the formation of the electrodes.

Lastly, a prototype of this biodevice was developed. We present the results of its performance when immersed in physiological saline solution and afterwards we assess its applicability in electronic medical devices for low power consumption.

**Keywords:** Biodevice; Policaprolactone; Electrospinning; Simulated biological fluids; Cyclic voltammetry.

# Lista de acrónimos e símbolos

---

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**Ag** Prata

**Al** Alumínio

**ARN** Ácido ribonucleico

**Au** Ouro

**C-E** Contra Eléctrodo

**DMF** Dimetilformamida

**DSC** Do inglês: *Differential scanning calorimetry* (Calorimetria Diferencial de Varimento)

**E-T** Eléctrodo de trabalho

**FT-IR** Do inglês: *Fourier Transform- Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier)

**NaCl** Cloreto de Sódio

**NPs** Nanopartículas

**p/p** Percentagem em peso

**PBS** Do inglês: *Phosphate buffered saline*

**PCL** Policaprolactona

**PPy** Polipirrol

**Ref.** Eléctrodo de referência

**SBF** Do inglês: *Simulated Body Fluid*

**SEM** *Scanning Electron Microscope* (Microscopia Electrónica de Varrimento)

**V** Tensão/Potencial eléctrico

**v/v** Percentagem em volume

**VC** Voltametria Cíclica

**W** Potência

**$\sigma$**  Condutividade

# Índice

---

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Lista de acrónimos e símbolos.....	iv
Índice.....	v
Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Objectivos.....	x
<b>Capítulo 1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Contextualização .....	1
1.2. Estado da Arte .....	2
1.3. Importância dos separadores.....	5
1.4. Aplicabilidade do estudo efectuado .....	5
<b>Capítulo 2. Características do Biodispositivo .....</b>	<b>7</b>
2.1. Polímeros .....	7
2.1.1. Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) .....	7
2.1.2. Matriz polimérica de PCL.....	8
2.2. Electrofiação.....	9
2.2.1. Processo .....	9
2.2.2. Parâmetros de Electrofiação .....	10
2.3. Eléctrodos Biocompatíveis.....	11
2.3.1. Materiais .....	11
2.3.2. Polímeros Condutores.....	11
2.3.3. Polipirrol .....	12
2.3.4. Nanopartículas.....	13
2.3.5. Caracterização das Nanopartículas.....	16
<b>Capítulo 3. Técnicas e procedimento experimental.....</b>	<b>17</b>
3.1. Preparação da solução.....	17
3.2. Electrofiação.....	17
3.3. Biodegradação das membranas .....	18
3.3.1. <i>Phosphate buffered saline</i> (PBS).....	18
3.3.2. Manutenção do meio.....	19



3.3.3.	Perda de massa.....	19
3.4.	Caracterização das membranas .....	20
3.4.1.	Morfologia .....	20
3.4.2.	Propriedades Físico-Químicas .....	23
3.4.3.	Propriedades Eléctricas e Electroquímicas.....	24
3.4.4.	Propriedades Mecânicas .....	30
3.5.	Produção e caracterização dos eléctrodos .....	32
3.5.1.	Síntese de Nanopartículas de Ouro .....	32
3.5.2.	Síntese de Nanopartículas de Prata .....	33
3.5.3.	Funcionalização do PCL com Nanopartículas de Ouro e de Prata .....	33
3.5.4.	Funcionalização do PCL com Pirrol (Py) .....	34
3.5.5.	Produção de filmes .....	35
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Análise dos Resultados.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Estudo da degradação das membranas de PCL em PBS .....	36
4.1.1.	Perda de massa.....	36
4.1.2.	Morfologia .....	38
4.1.3.	Calorimetria diferencial de varrimento (DSC) .....	40
4.1.4.	Propriedades Mecânicas .....	41
4.2.	Funcionalização das membranas de PCL .....	42
4.2.1.	Nanopartículas de Ouro e Prata .....	43
4.2.2.	Fotoluminescência.....	46
4.3.	Caracterização dos eléctrodos .....	47
4.3.1.	Propriedades Físico-Químicas .....	47
4.3.2.	Propriedades eléctricas e electroquímicas.....	49
4.4.	Caracterização do dispositivo electroquímico .....	56
4.4.1.	Propriedades Electroquímicas .....	56
4.5.	Desenvolvimento de um Protótipo .....	59
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusões e perspectivas futuras.....</b>	<b>60</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>.....</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>66</b>

# Índice de Figuras

---

Figura 1.1 Ilustração adaptada da bateria desenvolvida por Ki Bang Lee em 2005 [6].	3
Figura 1.2 Ilustração do material compósito ultrafino desenvolvido por Pushparaj et al. para aplicação em baterias (adaptado de [7]).	3
Figura 1.3 Ilustração da membrana de acetato de celulose revestida com prata e alumínio desenvolvida por Baptista et.al (adaptado de [8]).	4
Figura 1.4 Ilustrações das medições efectuadas pelo protótipo desenvolvido por Neto et.al em 2010 (adaptado de [9]).	4
Figura 2.1 a) Estrutura molecular da $\epsilon$ -caprolactona, b) estrutura molecular do PCL (adaptado de [13]).	8
Figura 2.2 Esquema simbólico de um sistema de electrofiação (adaptado de [9]).	9
Figura 2.3 Estrutura química do polipirrol (adaptado de [19]).	12
Figura 3.1 Ilustração da electrofiação e deposição das fibras de PCL num colector rotatório (adaptado de [9]).	18
Figura 3.2 Esquema simbólico da deposição da matriz polimérica sobre o eléctrodo de trabalho.	25
Figura 3.3 Montagem experimental das células de medida de corrente eléctrica no interior da caixa de Faraday e respectivos eléctrodos: contra-eléctrodo (C-E), eléctrodo de referência (Ref.) e eléctrodo de trabalho (E-T).	26
Figura 3.4 Célula electroquímica para medição da corrente eléctrica em amostras sólidas.	26
Figura 3.5 a) Montagem experimental da célula de medida de corrente eléctrica no interior da caixa de Faraday e respectivos eléctrodos: contra-eléctrodo (C-E), eléctrodo de referência (Ref.) e eléctrodo de trabalho (E-T); b) Esquema ilustrativo da célula electroquímica e respectiva indicação dos eléctrodos (adaptado de [9]).	27
Figura 3.6 Equipamento utilizado para efectuar as medições relativas à condutividade eléctrica.	30
Figura 3.7 Curva de tracção mecânica típica de um material polimérico.	31
Figura 3.8 (a) Equipamento para realização dos testes de tracção; (b) tracção de uma amostra.	32
Figura 3.9 Imagem da solução de nanopartículas de ouro.	33
Figura 3.10 Imagem da solução de nanopartículas de prata.	33
Figura 3.11 Imagens da máquina utilizada na produção de filmes e respectiva régua Gradner.	35
Figura 4.1 Gráfico da percentagem de perda de massa das membranas de PCL em função do tempo de imersão em PBS.	37
Figura 4.2 Análise DSC para duas amostras de PCL diferentes, onde se observa a variação da Temperatura e Entalpia de Fusão com o tempo de degradação; a) Amostra de PCL não sujeita a biodegradação; b) Amostra de PCL após 4 semanas em solução salina (PBS).	40
Figura 4.3 Curva de tracção típica obtida para amostras com cerca de 0,050mm de espessura.	41
Figura 4.4 Espectro de absorvância das nanopartículas de Ouro.	43
Figura 4.5 Imagens TEM das Nanopartículas de Ouro.	44
Figura 4.6 Histograma relativo à medição dos diâmetros para as Nanopartículas de Ouro a partir das imagens de TEM.	44
Figura 4.7 Espectro de absorvância das nanopartículas de Prata.	45
Figura 4.8 Imagens TEM das Nanopartículas de Prata sintetizadas.	45
Figura 4.9 Histograma dos diâmetros das Nanopartículas de Prata, obtidos a partir das imagens de TEM.	45
Figura 4.10 Fibras de PCL com NPs de Ouro observadas ao microscópio óptico de fluorescência para comprimentos de onda na gama do UV, verde e azul, respectivamente.	46
Figura 4.11 Fibras de PCL com NPs de Prata observadas ao microscópio óptico de fluorescência para um comprimento de onda na gama do UV e do azul, respectivamente.	46

Figura 4.12 Espectro de infravermelho obtido para a membrana de PCL e para a membrana de PCL funcionalizada com NPs e PPy. ....	48
Figura 4.14 Voltamograma da membrana de PCL (espessura igual a 0,025mm e área de $1\pm 0,5\text{cm}^2$ ) após electrodeposição de NPs de Ouro e imersão numa solução de SBF; Voltamograma da membrana de PCL após aplicação de uma corrente de 2,5mA durante 2 minutos e posterior electrodeposição de NPs de Ouro seguida de imersão numa solução de SBF. ....	50
Figura 4.15 Imagem SEM da membrana após aplicação de uma corrente de 2,5mA durante 2 minutos e posterior electrodeposição de NPs de Ouro por Voltametria Cíclica. ....	51
Figura 4.16 Voltamograma da membrana de PCL (espessura igual a 0,025mm e área de $1\pm 0,5\text{cm}^2$ ) imersa numa solução de SBF e da membrana de PCL após electrodeposição de NPs de Prata por Voltametria Cíclica, seguida de imersão numa solução de SBF. ....	52
Figura 4.17 Imagem SEM da membrana após electrodeposição de NPs de Prata por Voltametria Cíclica, seguida de imersão numa solução de SBF. ....	52
Figura 4.18 Voltamograma da membrana de PCL após imersão numa solução de 0,9% de NaCl. ....	53
Figura 4.19 Voltamograma da membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro e Prata através de electrofiação, após imersão numa solução de 0,9% de NaCl. ....	54
Figura 4.20 Voltamograma da membrana de PCL funcionalizada com Py através de electrofiação, após imersão numa solução de 0,9% de NaCl. ....	54
Figura 4.21 Voltamograma do Ciclo 10 obtido para o dispositivo NPs <sub>Au</sub> /Membrana/PPy para um Scan Rate de $80\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ....	56
Figura 4.22 Voltamograma do Ciclo 7 obtido para o dispositivo NPs <sub>Ag</sub> /Membrana/Py para um Scan Rate de $80\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ....	57
Figura 4.23 Voltamograma para as duas estruturas analisadas com um Scan Rate de $80\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; ....	58
Figura 4.24 Gráfico da densidade de Potência e de corrente em função da tensão para dispositivo NPs <sub>Au</sub> /Membrana 0,050mm/PPy. ....	58
Figura 4.25 Fotografia do protótipo realizado: colocação do terminal do multímetro sobre os eléctrodos do dispositivo através de fios de carbono. ....	59
Figura 4.26 Fotografia da medição do valor de tensão (V) do dispositivo, NPs <sub>Au</sub> /Membrana 0,050mm/PPy após adição de soro fisiológico. ....	59
Figura 6.1 Curva I-V relativa a uma membrana apenas de PCL. ....	66
Figura 6.2 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro por intermédio da técnica de electrospinning. ....	66
Figura 6.3 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Prata por intermédio da técnica de electrospinning. ....	67
Figura 6.4 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com Py por intermédio da técnica de electrospinning; ....	67
Figura 6.5 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Prata através de electrodeposição por VC. ....	68
Figura 6.6 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro através de electrodeposição por VC. ....	68
Figura 6.7 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com PPy através de electrodeposição por VC. ....	69

# Índice de Tabelas

---

Tabela 3.1 Condições utilizadas no processo de electrofiação das membranas de PCL; .....	18
Tabela 3.2 Informação relativa aos reagentes utilizados na preparação da solução de PBS; .....	19
Tabela 3.3 Comparação entre as concentrações iónicas do plasma humano e de soluções sintéticas [mM] [31]; .....	28
Tabela 3.4 Reagentes utilizados na preparação da solução de SBF; .....	29
Tabela 4.1 Dados relativos à perda de massa de membranas com 2h de deposição e espessuras na ordem dos 0,050mm; .....	37
Tabela 4.2 Imagens SEM e fotografias das membranas de PCL (espessura de 0,050mm) após biodegradação em PBS; .....	38
Tabela 4.3 Dados relativos à Temperatura e Entalpia de Fusão obtidos para as membranas de PCL após biodegradação.....	41
Tabela 4.4 Valores médios e desvios padrão determinados para os parâmetros mecânicos. ....	42
Tabela 4.5 Número de onda correspondente ao tipo de vibração e ligação presentes na membrana de PCL. ....	48
Tabela 4.6 Dados relativos ao cálculo da condutividade para as amostras em análise; .....	55

# Objectivos

---

A dissertação seguidamente apresentada surgiu da investigação realizada no Departamento de Ciência dos Materiais da FCT/UNL e no CENIMAT/I3N, durante um semestre.

O objectivo deste trabalho consistiu na produção e caracterização de membranas de nano/micro fibras de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) por electrofiação a fim de determinar o seu potencial de aplicação num biodispositivo electrónico de baixo consumo que gere energia quando em contacto com fluidos biológicos, como o sangue ou o suor. A principal característica deste biodispositivo deve ser a biocompatibilidade e a biodegradabilidade para que após o desempenho das suas funções este seja totalmente absorvido pelo corpo humano sem causar reacções adversas. Por outro lado, também a elevada flexibilidade e espessura reduzida devem ser factores a ter em conta na produção do mesmo. Assim, para alcançar o objectivo principal foi necessário realizar um estudo que consistiu em determinar o tempo de degradação das membranas num meio simulador de fluidos corporais (PBS). Para além disso, foi também necessário avaliar o potencial electroquímico destas membranas após a imersão em diferentes fluidos simulados.

A motivação deste trabalho deve-se principalmente a dois projectos realizados anteriormente:

a) Primeiro em 2009, surgiram os resultados pioneiros obtidos por Ana Baptista que ao longo de um ano de dissertação de Mestrado, desenvolveu um protótipo de uma biobateria constituída por uma membrana de acetato de celulose.

b) No ano seguinte Joana Neto, desenvolve estudo similar mas noutro polímero, policaprolactona inspirado na publicação de 2010 da *Technology Review* (Bourzac, K., 2010), que selecciona como uma das tecnologias mais emergentes o desenvolvimento de biodispositivos electrónicos implantáveis e biodegradáveis após o cumprimento do tempo das suas funções. Assim, esta investigação surge para dar continuidade a esses trabalhos de modo a aprofundar o conhecimento sobre a biodegradabilidade dos polímeros estudados.

O trabalho está dividido em três fases:

- i) A primeira fase consiste no processamento das membranas de polímero biocompatível, neste caso a policaprolactona aprovada pela *US Food And Drug Administration*, através da técnica de *electrofiação*;
- ii) A segunda fase prende-se com o estudo da degradabilidade das membranas na presença de uma solução salina à base de fosfatos (PBS);
- iii) Por último, a aplicação de eléctrodos biocompatíveis às membranas produzidas:
  - a) Polímeros condutores;
  - b) Polímeros funcionalizados com nanopartículas e estudos das respectivas características electroquímicas quando imersas em diferentes bio-fluidos simulados.

Relativamente à estrutura da Dissertação esta contém 5 capítulos, sendo que o Capítulo 1 é composto pela introdução onde se efectua uma avaliação do estado da arte relativamente a esta tecnologia, respectivas aplicações e factores a ter em conta na sua concepção. No capítulo 2 realiza-se a caracterização do biodispositivo assim como a referência aos eléctrodos biocompatíveis a utilizar. Posteriormente, o Capítulo 3 expõe uma síntese acerca das técnicas e procedimentos experimentais utilizados durante o trabalho. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos e, por último no Capítulo 5 são apresentadas as conclusões e algumas perspectivas futuras.

## Capítulo 1. Introdução

Neste primeiro capítulo apresenta-se uma síntese do estado de arte relativamente aos biodispositivos electrónicos implantáveis e biodegradáveis assim como algumas aplicações em diversas áreas e também possíveis inovações a longo prazo. Salienta-se ainda a miniaturização, portabilidade e a capacidade de produção de energia eléctrica de forma auto-suficiente destes biodispositivos.

### 1.1. Contextualização

A procura de novas fontes de energia e a preocupação com o meio ambiente é cada vez mais sentida na sociedade actualmente. Torna-se, portanto, importante a criação de dispositivos de baixo custo e mais ecológicos para fazer face a estas necessidades [1].

O desempenho destes dispositivos é dependente das propriedades dos materiais que são utilizados. Os nanomateriais possuem propriedades eléctricas e ópticas interessantes sendo por isso largamente utilizados na área da microelectrónica [1]. As nanofibras de biopolímeros aliadas a estes nanomateriais permitem a produção de um biodispositivo miniaturizado, permitindo uma redução na quantidade de material utilizado assim como na energia consumida durante o processo de fabrico. As nanofibras possuem diâmetros que oscilam na ordem dos micro até aos nanómetros, tendo por isso uma área superficial elevada que facilita a sua funcionalização superficial e consequente modificação das suas propriedades. A reduzida dimensão, a sensibilidade e a flexibilidade associadas às nanofibras semicondutoras tornam-nas especialmente úteis na produção de biodispositivos.

Desta forma, a criação de dispositivos electroquímicos que convertam energia química associada a um fluido biológico como o sangue, a urina ou o suor em energia eléctrica têm sido alvo de diversas investigações por parte da comunidade científica, devido também às potencialidades que estes dispositivos apresentam, tais como a capacidade de monitorização da concentração de glucose em doentes com patologias como a diabetes; controlo da temperatura local na detecção de possíveis infecções após cirurgia, implantes neuronais e bioestimuladores eléctricos. Por outro lado, podem também ser utilizados na produção de dispositivos médicos electrónicos de baixo consumo, tais como o *pacemaker*, facilitando a sua alimentação eléctrica, ou mesmo em sistemas de libertação de fármacos [2].

### 1.2. Estado da Arte

A tecnologia referente aos biodispositivos sofreu na última década, tal como já tinha sido referido anteriormente, um acentuado progresso nas mais diversas áreas e aplicações pelo que as novas tendências associadas a algumas limitações destes biodispositivos têm motivado diversas pesquisas que visam a produção de energia eléctrica de forma auto-suficiente [3]. Destas pesquisas surgem baterias inovadoras como as de películas finas que fornecem diversas opções conjugando *design* com a capacidade de armazenamento, tensão de saída e dimensão. As microcélulas de combustível surgem também como uma fonte de energia para microdispositivos electrónicos. Ambas as tecnologias envolvem a conversão de energia química em electricidade mas, enquanto uma pilha ou bateria convencional emprega reacções entre os eléctrodos e eletrólitos cuja natureza química sofre alterações, ao longo do tempo, a célula de combustível consome o seu próprio combustível, deixando apenas um reservatório vazio [4]. As microcélulas de combustível possuem aplicações que incluem uma gama que se estende desde os computadores portáteis, aos telemóveis, PDA's e dispositivos digitais que se destinam a segmentos como a indústria e os cuidados de saúde. Algumas células de combustível específicas apresentam-se particularmente interessantes no desenvolvimento de dispositivos implantáveis, uma vez que estes podem ser conseguidos através de fluidos corporais (glicose e oxigénio presente no sangue) como fonte de combustível [5].

Em 2005, cientistas de Singapura desenvolveram uma bateria que utiliza urina humana como combustível, apesar da sua fonte de energia pouco atractiva a bateria tem uma grande variedade de aplicações na detecção de doenças como o cancro ou a hepatite, podendo mesmo vir a ser adaptado de forma a fornecer energia a outros dispositivos electrónicos, tais como implantes que possibilitam a medição dos níveis de açúcar no sangue em pacientes diabéticos. Ao adicionar um pouco de urina, a estrutura da biobateria (camada de cobre e magnésio, papel de filtro dopado com cloreto de cobre e duas camadas de plástico, ver figura 1.1) tende a dissolver-se viabilizando a ocorrência de reacções que motivam a produção de energia eléctrica. Para este estudo experimental, a bateria apresentou uma tensão de 1,47 V e uma potência máxima de 105 mW, empregando uma resistência de 1k $\Omega$  [6].



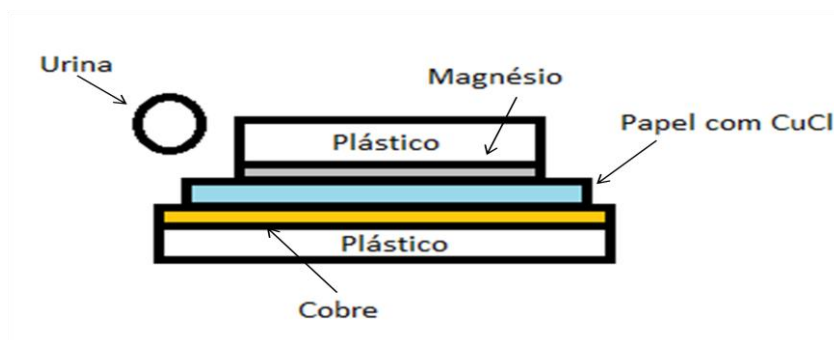


Figura 1.1 Ilustração adaptada da bateria desenvolvida por Ki Bang Lee em 2005 [6].

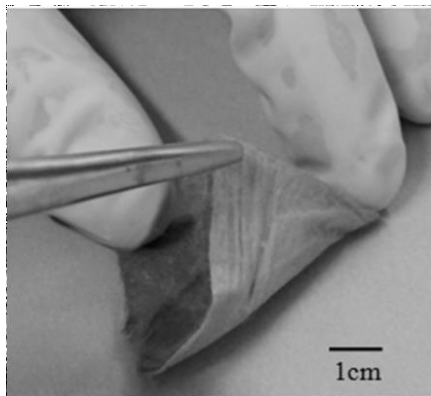
Um grupo de cientistas do Rensselaer Polytechnic Institute (2007) [7] concebeu uma biobateria constituída por 90% de celulose e 10% de nanotubos de carbono alinhados, o que permite que o papel adquira capacidades condutoras e uma tonalidade escura, através de electrólitos provenientes de fluídos corporais como a urina e as lágrimas. Os nanotubos são impressos no próprio tecido do papel, criando o que se denomina de papel nanocompósito. Através da nanotecnologia, da pequena dimensão da bateria, da flexibilidade e da reposição de eletrólitos encontram-se reunidas todas as condições para que este dispositivo seja útil em aplicações médicas. Os autores desta pesquisa sugerem que a bateria possa, no futuro, ser impressa em folhas longas, que poderiam então ser cortadas em forma de pilhas. Por outro lado, podem-se também agrupar várias folhas dando origem a baterias úteis em implantes médicos, como *pacemaker*, corações artificiais ou próteses avançadas. Outra característica a salientar prende-se também com o facto desta biobateria ser facilmente implantada sob a pele sem causar qualquer desconforto ao utilizador.



Figura 1.2 Ilustração do material compósito ultrafino desenvolvido por Pushparaj et al. para aplicação em baterias (adaptado de [7]).

O trabalho de investigação realizado por Baptista (2009) [8] consistiu no desenvolvimento de uma estrutura monolítica que é composta por uma membrana de acetato de celulose sobre a qual são depositados, em ambas as faces, eléctrodos metálicos de filme fino. O protótipo

produzido demonstrou possuir uma potência de  $3.38 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ , empregando como electrólito uma pequena gota de solução salina NaCl 0.9% (p/p).



*Figura 1.3 Ilustração da membrana de acetato de celulose revestida com prata e alumínio desenvolvida por Baptista et.al (adaptado de [8]).*

No ano seguinte Neto [9] também desenvolveu uma estrutura monolítica semelhante que utiliza uma membrana de policaprolactona sobre a qual são igualmente depositados eléctrodos metálicos, cujo comportamento electroquímico para as duas estruturas formadas, Ag/ Membrana/ Al e AuNiCu (rede) / Membrana/ Al, foi avaliado na presença de fluido biológico simulado. Deste modo, concluiu-se que estas estruturas apresentam comportamentos electroquímicos distintos, sendo os valores de corrente e tensão mais promissores para a estrutura AuNiCu (rede) / Membrana / Al apresentando uma potência máxima de  $16 \mu\text{W}.\text{cm}^{-2}$ .



*Figura 1.4 Ilustrações das medições efectuadas pelo protótipo desenvolvido por Neto et.al em 2010 (adaptado de [9]).*

Desta forma, constatou-se que todas as investigações relatadas ao longo da última década tiveram como principal objectivo a concepção de um biodispositivo flexível que gere energia de forma auto-suficiente através da conversão da energia química dos compostos presentes

nos fluidos biológicos, por intermédio de processos electroquímicos. Por outro lado pretende-se também que estes sejam susceptíveis de miniaturização e integração em dispositivos electrónicos cumprindo todos os requisitos de biocompatibilidade e biodegradabilidade para que não ocorra qualquer tipo de reacção adversa no organismo.

### 1.3. Importância dos separadores

Numa célula electroquímica um separador deve tratar-se de uma membrana porosa de elevada condutividade iónica e baixa condutividade electrónica de modo a permitir as trocas iónicas entre os eléctrodos e a impedir a formação de curto-circuitos entre os mesmos (o que acontece quando a condutividade eléctrica é elevada). As membranas obtidas por electrofiação de biopolímeros possuem estas duas características principais, para além de serem homogéneas e com elevada estabilidade electroquímica. Desta forma, a técnica de electrofiação é um dos métodos de produção de nanofibras actualmente mais utilizado uma vez que possibilita a produção de separadores alternativos. Consequentemente, o estudo de matrizes de nanofibras poliméricas de troca iónica tornou-se numa opção bastante vantajosa na aplicação de separadores para baterias. No que se refere ao transporte dos iões, através das membranas, este é caracterizado pela existência de interacções fortes entre as espécies permeáveis e a estrutura molecular do polímero devido à existência de grupos propícios à troca iónica na estrutura, o que faculta a permeabilidade ou migração dos iões de acordo com a sua carga específica [8].

### 1.4. Aplicabilidade do estudo efectuado

Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) é um polímero biodegradável com excelente biocompatibilidade e flexibilidade, daí ter despertado um grande interesse em diversas áreas, como a produção de *scaffolds* para Engenharia de Tecidos, sistemas de libertação de fármacos e aplicações na área da microelectrónica [10,11].

A biocompatibilidade deste polímero torna-o um bom candidato para a produção de matrizes de nanofibras poliméricas, como se pretende neste trabalho. Estas matrizes, produzidas pela técnica de electrofiação a partir de uma solução de PCL, para além de suporte físico (substrato), são utilizadas também como separador e meio de condução de iões, sendo os eléctrodos depositados em ambas as faces da membrana formada pela matriz.

Por outro lado, na vanguarda do desenvolvimento tecnológico surge a produção de dispositivos microelectrónicos médicos implantáveis cuja capacidade de auto-degradação volvido o período de funcionamento é uma característica indispensável, eliminando a necessidade de cirurgia para remoção do implante, daí a importância da utilização de um polímero biodegradável como o PCL [12].

Assim, a elevada flexibilidade adquirida pelo dispositivo, a espessura reduzida, a biocompatibilidade e biodegradabilidade facultadas pelo material escolhido, permitiram o desenvolvimento de um dispositivo inovador activado por fluidos biológicos como o sangue, a urina ou o suor (solução electrolítica).

## Capítulo 2. Características do Biodispositivo

Neste capítulo serão referidos os princípios físicos da técnica de electrofiação e os parâmetros que influenciam o processo, assim como os conceitos relativos aos polímeros condutores e polímeros funcionalizados com nanopartículas.

Tendo em conta o objectivo principal do trabalho, neste capítulo aborda-se a aplicabilidade actual dos polímeros em geral e do PCL em particular, tal como as suas principais propriedades e características, tendo em vista a biocompatibilidade do dispositivo final.

### 2.1. Polímeros

Os polímeros são macromoléculas de elevada massa molecular constituídos por unidades estruturais (unidades repetitivas ou meros) cuja repetição determina o denominado grau de polimerização. No que respeita à sua origem podem ser classificados como naturais ou sintéticos. A formação dos polímeros naturais implica o crescimento das cadeias poliméricas, com o aumento do grau de polimerização e a catálise enzimática, fenómenos ocorridos nos ciclos de crescimento dos seres vivos. Os polímeros sintéticos são produzidos através de reacções de polimerização em cadeia ou reacções de polimerização por passos. Nas primeiras, moléculas de baixo peso molecular iguais (homopolímeros) ou diferentes (copolímeros) ligam-se covalentemente, sem libertação de outras moléculas. Por outro lado, nas reacções de polimerização por passos, monómeros com grupos reactivos diferentes reagem entre si formando novas ligações, com libertação de pequenas moléculas como a água [10].

Relativamente aos biopolímeros, estes podem ser designados por não degradáveis ou biodegradáveis, dependendo do seu comportamento na presença de tecidos biológicos.

O interesse da utilização de polímeros biodegradáveis como a policaprolactona, prende-se com o facto de os produtos de degradação serem absorvidos pelo corpo dispensando assim a sua remoção cirúrgica. Para serem utilizados em medicina, estes polímeros devem ser também biocompatíveis, esterilizáveis e de estabilidade controlável [11].

#### 2.1.1. Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

O Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) é um poliéster biodegradável, semi-cristalino e alifático, com um grau de cristalinidade que pode ir até aos 69%. O PCL pode ser produzido por intermédio de dois métodos diferentes, através da policondensação de um ácido hidrocarboxílico e da polimerização por abertura de anel (Figura 2.1) de uma lactona (éster cíclico – produto da

condensação de um grupo funcional álcool e um grupo ácido carboxílico na mesma molécula). As suas propriedades físicas, térmicas e mecânicas dependem do seu peso molecular e do grau de cristalinidade. À temperatura ambiente, é solúvel em vários solventes tais como clorofórmio, dimetilacetamida, acetona e ácido acético, sendo no entanto insolúvel em álcoois e água. A biodegradabilidade deste polímero deve-se à susceptibilidade da ligação éster à hidrólise, sendo os produtos gerados metabolizados pela via do ciclo do ácido tricarboxílico ou eliminados directamente por excreção renal, este processo pode levar meses ou até anos, dependendo do seu peso molecular, do grau de cristalinidade e das condições de degradação. No entanto, existem na natureza diversos micróbios capazes de degradar completamente este polímero. A sua degradação é autocatalisada por ácidos carboxílicos libertados durante a hidrólise ou também pode ser catalisada por enzimas, resultando numa decomposição mais acelerada. Desta forma, pode-se afirmar que o PCL é um polímero biodegradável com excelente biocompatibilidade e flexibilidade, o que tem despertado crescente interesse em muitas áreas, tais como matrizes para Engenharia de Tecidos, sistemas de libertação controlada de fármacos e aplicações na área da microelectrónica. No entanto, este apresenta algumas desvantagens já conhecidas como por exemplo, o elevado tempo de degradação quando comparado com outros polímeros biodegradáveis e as fracas propriedades mecânicas enquanto *scaffold*, o que limita a sua utilização em tecidos mais duros [10, 11, 13].

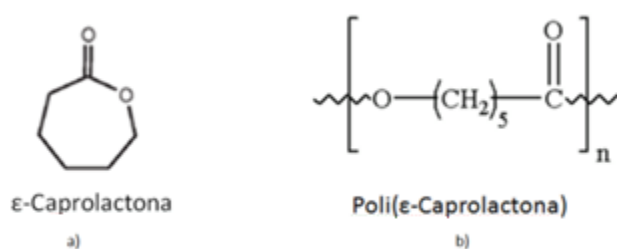


Figura 2.1 a) Estrutura molecular da  $\epsilon$ -caprolactona, b) estrutura molecular do PCL (adaptado de [13]).

### 2.1.2. Matriz polimérica de PCL

Com base no que foi referido anteriormente, torna-se evidente a razão pela qual se procedeu à escolha deste polímero para a produção das matrizes por electrofiação, uma vez que uma elevada área superficial que facilite a ocorrência de reacções electroquímicas quando em contacto com um electrólito, assim como a migração deste devido à porosidade das membranas, são factores muito importantes a ter em conta. É de notar também que a

utilização de uma membrana porosa, homogênea e com elevada estabilidade electroquímica facilita a transferência de iões.

## 2.2. Electrofiação

A electrofiação é um método simples que permite a produção de fibras com diâmetros que variam de nanómetros a micrómetros. Comparando com outros suportes, a matriz produzida por electrofiação possui uma porosidade e área superficial elevadas, sendo semelhante à matriz extracelular natural. Assim, pode-se afirmar que esta técnica apresenta diversas potencialidades na produção de scaffolds em engenharia de tecidos, na produção de vasos sanguíneos artificiais e em sistemas de libertação de fármacos no campo da Biomédica sendo que, por isso, tem vindo a receber especial atenção nos últimos anos [14, 15, 16].

### 2.2.1. Processo

A Figura 2.2 ilustra uma montagem de um sistema de electrofiação, o qual consiste em três componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma agulha metálica e um colector (ligado à terra). A agulha está ligada a uma seringa que contém a solução polimérica. Com a utilização de um controlador do caudal, a solução pode assim fluir através da agulha a uma taxa constante seleccionada pelo utilizador [15, 16, 17].

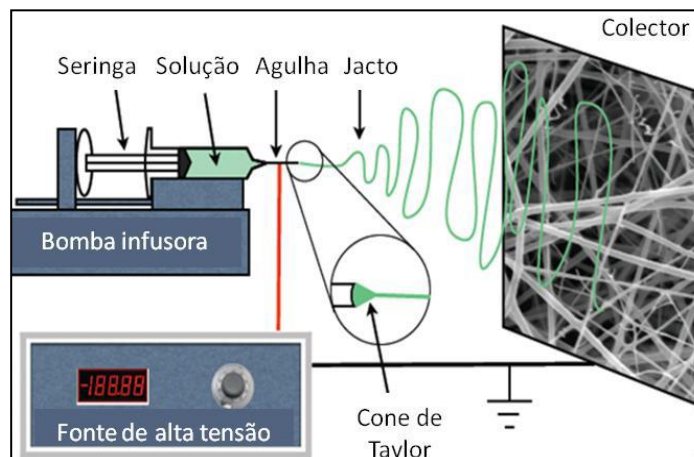


Figura 2.2 Esquema simbólico de um sistema de electrofiação (adaptado de [9]).

A aplicação de um potencial eléctrico à agulha, além de criar um campo eléctrico entre a agulha e o colector de fibras, origina uma distribuição superficial de carga no polímero que se encontra na extremidade da agulha, dando origem a uma repulsão entre as moléculas da solução. Para valores suficientemente elevados de potencial, esta repulsão vence a tensão

superficial e um jacto, carregado electricamente, descreve um percurso entre a agulha e o colector e cujo diâmetro diminui à medida que se afasta da ponta da agulha. A repulsão electrostática entre as cargas no jacto provoca uma trajectória instável e uma maior diminuição do diâmetro. É nesta fase que se formam as fibras, devido ao estiramento da solução e evaporação do solvente, sendo estas guiadas em direcção ao colector devido à presença do campo eléctrico, depositando sob a forma de uma matriz de nanofibras. Alterações no perfil do campo traduzem-se em alterações morfológicas das fibras e na sua área de deposição [16, 17].

### 2.2.2. Parâmetros de Electrofiação

O processo de electrofiação de uma solução polimérica, a regularidade e os diâmetros das fibras obtidas estão directamente relacionados com diferentes parâmetros, quer da solução (viscosidade, tensão superficial, condutividade eléctrica e taxa de evaporação) quer do processo (tensão aplicada à agulha, caudal de solução, diâmetro da agulha, distância entre a agulha e o colector, geometria do colector e a sua rotação, bem como a tensão aplicada ao mesmo), como também factores ambientais (temperatura ambiente e humidade relativa).

A variação da tensão aplicada à agulha provoca alterações no campo eléctrico gerado entre a agulha e o colector e também alterações na carga da solução polimérica. Um aumento na diferença de potencial aplicado à agulha induz um aumento da intensidade do campo eléctrico, e consequentemente uma maior aceleração da fibra ejectada em direcção ao colector. Desta forma, a tensão aplicada não deve ser demasiado elevada para que não se verifique a quebra das fibras, nem demasiado baixa para que não exista projecção de gotas de solução para o colector. Relativamente à carga do polímero, esta vai provocar uma repulsão entre os elementos do fio da solução, que se revela um factor importante a ter em conta na determinação do diâmetro das fibras, visto que mais carga se traduz num maior estiramento do fio e fibras mais finas. As forças viscoelásticas entre as moléculas do polímero na solução são determinadas pela sua viscosidade, a qual depende da concentração do polímero e do seu peso molecular. Assim, estas devem ser fortes o suficiente para impedir a interrupção da fibra durante o seu estiramento, não devendo contudo inibi-lo.

A quantidade de polímero que sai da agulha depende do caudal imposto pela bomba infusora. Valores de caudal mais baixos originam fibras relativamente mais finas do que os mais elevados. Contudo, valores demasiado baixos de caudal conduzem a quebras na continuidade da fibra e valores demasiado elevados a acumulação de solução na ponta da agulha originando projecções.



A variação da distância entre a agulha e o colector implica uma variação do campo eléctrico, pelo que os seus efeitos são sobreponíveis aos deste último [15].

### 2.3. Eléctrodos Biocompatíveis

Relativamente, à importância dos eléctrodos a aplicar no biodispositivo é de salientar que estes devem originar um campo eléctrico que induza a migração iónica dentro da matriz polimérica e também conservar as características da mesma, para que os fluidos biológicos consigam uma penetração viável na membrana.

#### 2.3.1. Materiais

Visto existirem diversos factores cruciais a ter em conta na escolha dos materiais que constituem os eléctrodos, tais como a biocompatibilidade e a biodegradabilidade torna-se necessário afastar todos os materiais que possuam substâncias nocivas ou tóxicas para o organismo. Assim, para que estes requisitos sejam garantidos procedeu-se à escolha de eléctrodos como o polipirrol e as nanopartículas de Ouro (Au) e Prata (Ag).

#### 2.3.2. Polímeros Condutores

Os polímeros condutores têm sido alvo de muitos estudos devido às suas aplicações em biossensores, dispositivos electrocrómicos, entre outras. Estes polímeros representam uma classe de “metais sintéticos” que combinam as propriedades químicas e mecânicas dos polímeros com as propriedades eléctricas de metais e semicondutores. Os polímeros intrinsecamente condutores mais comuns são a polianilina, polipirrol, politiofeno, poliacetileno, entre outros. A estrutura destes polímeros contém ligações duplas conjugadas que exibem propriedades como o baixo potencial de ionização, alta afinidade electrónica e por isso podem ser facilmente reduzidos ou oxidados.

As propriedades eléctricas dos polímeros condutores podem ser alteradas de forma reversível, podendo apresentar um carácter isolante ou de condutor metálico. A condutividade pode ser largamente aumentada através de dopagem, utilizando substituintes que podem ser agentes oxidantes ou redutores. Esta dopagem é acompanhada por métodos químicos de exposição directa do polímero a agentes de transferência de carga em fase gasosa ou solução, ou ainda por oxidação ou redução electroquímica. Este processo leva à formação de defeitos e

deformações na cadeia polimérica conhecidos como polarões e bi-polarões, os quais são responsáveis pelo aumento da condutividade [18, 19].

### 2.3.3. Polipirrol

O polipirrol é dos polímeros condutores mais estudados para diversos tipos de aplicações, no entanto o seu elevado custo quando comparado com outros tem-lhe conferido menor importância.

Este polímero pode ser sintetizado utilizando diversos tipos de oxidantes e também por via electroquímica. A polimerização oxidativa ocorre com a formação do catião radical intermédio, extremamente reactivo, onde o acoplamento se forma aleatoriamente, apresentando um grande número de defeitos e reticulações, para além de um défice de orientação entre as cadeias.

A síntese electroquímica do polipirrol permite a obtenção de filmes, os quais se apresentam no estado oxidado, ou seja, no estado dopado. O nível de dopagem depende fortemente das condições experimentais utilizadas, como o valor do potencial aplicado, o solvente, o electrólito de suporte, entre outros. A electropolimerização do pirrol ocorre para um potencial moderadamente positivo (1,0 a 1,3V).

O mecanismo de polimerização do polipirrol envolve a oxidação do pirrol a um catião radical, o qual se pode ligar a outro catião radical ou com uma molécula do monómero, seguida de uma transferência de carga. Nesta etapa são eliminados dois protões, formando-se um dímero neutro. A reacção continua como uma extensão desse oligómero, levando ao crescimento das cadeias poliméricas.

O polipirrol tem sido estudado em diversas aplicações como LED's, sensores químicos de solução, biossensores e sensores de gás [18, 19].

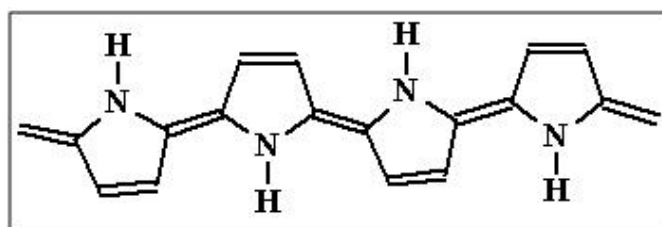


Figura 2.3 Estrutura química do polipirrol (adaptado de [19]).

### 2.3.4. Nanopartículas

A nanotecnologia trata-se de um campo científico multidisciplinar em fase de expansão. As partículas nanométricas oferecem novas propriedades estruturais, ópticas e electrónicas que não são possíveis de atingir de outra forma.

Desta forma, avanços na compreensão das características destas partículas como o tamanho, a forma e as propriedades superficiais para interações biológicas potenciam novas oportunidades no desenvolvimento de nanopartículas úteis em aplicações terapêuticas [20].

#### 2.3.4.1 Nanopartículas de Prata

As Nanopartículas de prata têm vindo a ganhar nas últimas décadas um interesse crescente devido às diversas propriedades que apresentam tais como boa condutividade, estabilidade química, actividade antibacteriana, antifúngica, anti-viral e anti-inflamatória. Daí que entre as aplicações mais comuns se encontrem os produtos médicos, que variam desde pomadas tópicas a ligaduras para a cura de feridas e que têm provado ser bastante eficazes no retardamento e prevenção de infecções bacterianas. No entanto, actualmente tem-se explorado frequentemente esta tecnologia resultando assim muitas aplicações quer na área da Biologia quer na Medicina tais como [20]:

- Marcadores biológicos fluorescentes;
- Sistema de libertação de fármacos;
- Bio-deteção de patogénios;
- Deteção de proteínas;
- Sondagem da estrutura do DNA;
- Engenharia de tecidos;
- Destruição do tumor através de aquecimento (hipertermia);
- Separação e purificação de moléculas biológicas e células;
- Melhoramento do contraste MRI;

#### **Síntese de nanopartículas de Prata**

A síntese atrai a atenção por parte dos investigadores devido às suas promissoras aplicações nas áreas de catálise electrónica, sensores e modificação de superfícies. Para a maioria das aplicações, as propriedades destas nanopartículas são determinadas pelo seu

tamanho, forma, composição e estrutura. Geralmente, as nanopartículas são preparadas por uma variedade de métodos químicos e físicos como a redução química, a redução fotoquímica, a redução eletroquímica e a vaporização por calor, entre outras. Os reagentes podem ser inorgânicos tais como boro-hidrato de sódio ou potássio, hidrazina e sais de tartarato, ou os orgânicos como citrato de sódio, ácido ascórbico e aminoácidos capazes de sofrer oxidação. Alguns destes reagentes são mencionados também como agentes estabilizantes. As aplicações biomédicas de nanopartículas de prata podem ser eficazes através da utilização de nanopartículas que minimizem factores como a toxicidade e o custo. Por isso, o desenvolvimento de melhores procedimentos experimentais para a síntese de nanopartículas de composições químicas diferentes, tamanhos, formas e polidispersão controlada é vital para o seu avanço. Recentemente, uma série de nanomateriais inorgânicos foram sintetizados por processos de bio-redução que empregam diferentes microrganismos [20].

### **Estrutura e propriedades funcionais**

Neste estudo as nanopartículas inorgânicas possuem uma estrutura básica que é constituída por um núcleo central que define propriedades de fluorescência, ópticas, magnéticas e electrónicas da partícula, com um revestimento orgânico que protege a superfície. Esta camada exterior protege o núcleo da degradação do ambiente fisiologicamente agressivo e pode formar ligações electrostáticas ou covalentes, ou ambas, com agentes carregados positivamente e biomoléculas que contêm grupos funcionais básicos tais como aminas e tióis. Dos três metais (prata, ouro, cobre) que exibem ressonâncias de *plasmon* no espectro visível, a prata exhibe a eficiência de excitação mais elevada. Este fenómeno em nanopartículas de prata é o mecanismo mais eficiente sendo reflexo da interacção da luz com a matéria. A prata é também o único material cuja ressonância de *plasmon* pode ser ajustada para qualquer comprimento de onda no espectro visível. O pico característico (420 nm) corresponde à ressonância de *plasmon* de superfície de nanopartículas de prata. Por outro lado, pode-se também analisar se a banda de *plasmon* é ou não simétrica o que indica se a solução contém ou não muitas partículas agregadas, confirmando-se posteriormente este facto através da microscopia electrónica. É possível afirmar tal facto uma vez que uma solução coloidal de nanopartículas de prata emite para comprimentos de onda na ordem dos 390 a 420 nm devido à dispersão de Mie [20].

### Toxicidade

A falta de informação sobre a toxicidade das nanopartículas coloca sérios problemas. Compreender as características dos nanomateriais e as suas interações com os sistemas biológicos é a chave para a implementação segura destes materiais no diagnóstico e terapêutica. Como tal tem-se procedido cada vez ao estudo do potencial de toxicidade, da distribuição biológica e da captação celular destas nanopartículas. Para as nanopartículas, como compostos químicos convencionais, existem três principais vias de exposição: inalação, absorção da pele e ingestão. Deve notar-se que as nanopartículas têm certas propriedades intrínsecas (por exemplo, pinocitose) que tornam mais fácil a sua entrada nas células. Ao nível celular, as nanopartículas podem ser encontradas em vários compartimentos ou mesmo no núcleo da célula, onde se encontra toda a informação genética [20].

#### 2.3.4.2 Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro tal como as de prata apresentam propriedades eléctricas e ópticas muito interessantes. Estes materiais possuem boa condutividade uma vez que os seus electrões não estão ligados a átomos individuais e não há formação da "nuvem" em torno dos núcleos atômicos. Por outro lado, também se sabe da mecânica quântica que os electrões se podem comportar como uma onda ou uma partícula. Se se imaginar que os electrões na nuvem apresentam uma forma de onda, com um determinado valor de energia, é possível que a luz do mesmo comprimento de onda seja absorvida pela nuvem de electrões, produzindo ressonância. Quando um metal absorve luz de um comprimento de onda de ressonância faz com que a nuvem de electrões vibre, dissipando-se energia. Este processo ocorre normalmente na superfície de um material (devido aos metais não serem transparentes à luz) e é por isso chamado de ressonância de *plasmon*. Nanopartículas de pequenas dimensões absorvem a luz na parte azul-verde do espectro ( $\approx 400\text{-}500\text{ nm}$ ), enquanto que a luz vermelha ( $\approx 700\text{ nm}$ ) é reflectida, produzindo uma tonalidade vermelha escura. Com o aumento da dimensão das partículas, o comprimento de onda de absorção da ressonância de *plasmon* desloca-se para comprimentos de onda mais longos, ou seja a luz vermelha é adsorvida e a azul reflectida o que produz partículas com uma cor azul ou púrpura pálido. Estas propriedades têm sido usadas para criar biossensores. As nanopartículas de ouro individuais aparecem normalmente a vermelho, no entanto quando estas agregam ocorre uma variação da ressonância de *plasmon*. Consequentemente, a partícula irá surgir como uma partícula maior, em vez de duas separadas e a ressonância de *plasmon* associada para comprimentos de onda

de absorção mudará de azul para vermelho, e luz reflectida de vermelho para azul. Portanto, constata-se que a cor da partícula irá mudar de vermelho para azul sempre que se verificar a ocorrência de agregação. O exemplo mais conhecido de aplicação de nanopartículas em sensores é o teste de gravidez. Embora este teste não dependa explicitamente da ressonância de *plasmon* para criar o sinal, a cor vermelha das nanopartículas utilizadas tem implicações directas nos resultados deste teste. Outros exames que exibem a vantagem da mudança da ressonância de *plasmon* incluem também testes para detecção de ADN. Por exemplo, um teste de ADN que tenha como objectivo encontrar determinadas bases. Neste teste, as nanopartículas começam como grandes agregados que apresentam a cor azul. Se a base de ADN complementar estiver presente, as nanopartículas vão ligar-se à base e não umas às outras, o que resulta na dissolução dos agregados originando uma cor vermelha escura, tal facto pode ser acompanhado através da utilização de um espectrofotómetro que tem como função medir a absorção de luz em diferentes comprimentos de onda [21, 22].

### 2.3.5. Caracterização das Nanopartículas

A caracterização de nanopartículas pode realizar-se através de técnicas como por exemplo dispersão dinâmica de luz (DLS), microscopia electrónica de varrimento (SEM) com análise química (EDS) e microscopia electrónica de transmissão (TEM), microscopia de força atómica (AFM), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia do UV-visível, espectroscopia de raios-X (XPS), difracção de raios-X (DRX) e por ressonância magnética nuclear (RMN) [20].

Neste trabalho utilizaram-se apenas as técnicas de espectroscopia de UV-visível e microscopia electrónica de transmissão (TEM), as quais se encontram descritas no capítulo seguinte.

## Capítulo 3. Técnicas e procedimento experimental

No presente capítulo são descritas, de forma sumária, as técnicas e os procedimentos experimentais utilizados durante a realização do trabalho.

- Produção da matriz polimérica de nanofibras através da técnica de electrofiação;
- Caracterização da membrana de PCL produzida, antes e depois da biodegradação e quando funcionalizada com polímeros condutores e nanopartículas: propriedades morfológicas e estruturais obtidas por Microscopia Electrónica de Varrimento; composição química por Espectroscopia de Infravermelho e EDS; propriedades eléctricas e electroquímicas obtidas por medidas de Voltametria Cíclica em diferentes biofluidos simulados;
- Por último, nova caracterização eléctrica e electroquímica das estruturas produzidas por intermédio de ensaios de Voltametria Cíclica, cujos resultados permitem avaliar e quantificar a eficiência dos biodispositivos produzidos.

### 3.1. Preparação da solução

Tendo em conta os estudos previamente realizados [9], a solução foi preparada com 13% de PCL ( $M_n \approx 80,000$ , Sigma-Aldrich) em Cloreto de Metileno (António Cruz, Material de Laboratório, LDA) e N,N-Dimetilformamida (Emplura) a 75:25% (v/v), respectivamente.

### 3.2. Electrofiação

O sistema de electrofiação utilizado é constituído por uma bomba infusora (Kd Scientific), uma seringa (Injekt 1 ml da B|Braun), uma agulha (Calibre 21 da ITEC) e uma fonte alta tensão (Glassman High voltage, inc.), tal como se encontra indicado no esquema na figura 2.2 e na fotografia da figura 3.1. O procedimento experimental utilizado na produção das nanofibras é o que se indica de seguida.

#### ***Procedimento Experimental***

Introduziu-se a solução referida anteriormente na seringa, removendo todo o ar residual manualmente, e posteriormente colocou-se a agulha. A seringa foi de seguida fixada na bomba

infusora, seleccionando-se o diâmetro desta assim como o caudal pretendido. No que respeita à fonte de alta tensão estabeleceu-se uma ligação desta com a agulha assim como do colector à terra. O colector é então posicionado em frente à bomba infusora, deslocando-se alguns centímetros relativamente ao centro e inicia-se a deposição das fibras, de acordo com os parâmetros que se encontram na tabela seguinte.

Tabela 3.1 Condições utilizadas no processo de electrofiação das membranas de PCL;

<b>Solução</b>	13% PCL em CM:DMF
<b>Seringa graduada</b>	1ml
<b>Agulha</b>	Calibre 21
<b>Distância</b>	10cm
<b>Tensão</b>	15kV
<b>Caudal</b>	0,8ml/h
<b>Humidade</b>	30 - 45%
<b>Temperatura</b>	20-25°C
<b>Alvo</b>	Rotatório
<b>Tempo de deposição</b>	2h

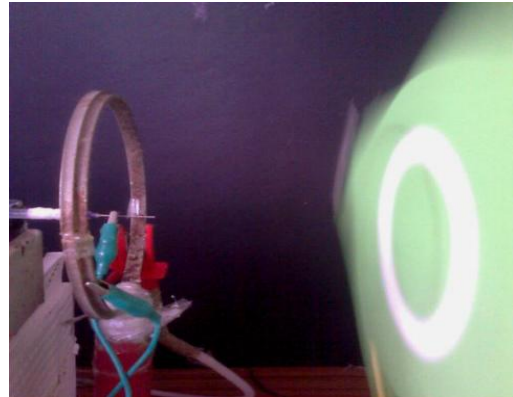


Figura 3.1 Ilustração da electrofiação e deposição das fibras de PCL num colector rotatório (adaptado de [9]).

### 3.3. Biodegradação das membranas

Para a realização dos testes de biodegradação das membranas utilizou-se uma solução sintética à base de fosfatos denominada por PBS (*Phosphate buffered saline*).

O PBS apresenta boas particularidades ao nível da Engenharia de Tecidos e cultura celular, uma vez que mantém o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, fornece iões orgânicos essenciais ao metabolismo celular e permite manter o pH do meio entre os 7,2 a 7,6. Devido às características anteriores é também muito comumente utilizado em estudos de biodegradação.

#### 3.3.1. *Phosphate buffered saline* (PBS)

A preparação do PBS não requer nenhum procedimento específico ao nível da preparação da solução, necessita apenas que se efectue uma verificação do pH e se tenha algum cuidado com a manutenção da solução.



### 3.3.1.1 Preparação da solução

Os reagentes são adicionados um a um, após dissolução total em 1l de água ultra-pura. Após a adição destes deve-se confirmar se o pH da solução é de aproximadamente 7. Posteriormente é necessário guardar a solução a uma temperatura de 5°C, aproximadamente.

Tabela 3.2 Informação relativa aos reagentes utilizados na preparação da solução de PBS;

Reagente	Quantidade [g/l]	Ião	Marca
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2586	$\text{K}^{2+}$ ; $\text{HPO}_4$	Panreac
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6837	$\text{K}^+$ ; $\text{HPO}_4^{2-}$	Panreac
KCl	10,657	$\text{K}^+$ ; $\text{Cl}^-$	Sigma-Aldrich

### 3.3.2. Manutenção do meio

Os estudos de degradação têm como objectivo principal analisar a perda de massa das membranas de PCL numa solução salina (PBS) de forma a retirar conclusões acerca da aplicação deste polímero na área da Biomédica, principalmente ao nível dos biodispositivos implantáveis e biodegradáveis. Para tal procedeu-se à colocação das membranas em caixas de Petri, adicionou-se o mesmo volume de solução em todas e, de seguida, colocaram-se na estufa a 37°C. De forma a garantir que o volume de solução em cada caixa não sofre alterações significativas e que não se reproduzem qualquer tipo de microrganismos procede-se à mudança do meio de quatro em quatro dias, lavando-se as caixas diversas vezes em água destilada para evitar que a concentração de sais aumente e que as condições do estudo sejam alteradas ao longo do tempo.

### 3.3.3. Perda de massa

De forma a quantificar a perda de massa das membranas ao longo do tempo procedeu-se à pesagem das mesmas, antes e depois de serem colocadas em meio biológico.

Nos poliésteres há quatro factores principais que permitem determinar os fenómenos de erosão e dissolução dos produtos de degradação, são estes a taxa constante de hidrólise da ligação éster, o coeficiente de difusão da água no interior da matriz polimérica, o coeficiente

de difusão dos fragmentos da cadeia dentro da matriz polimérica e a solubilidade dos produtos de degradação (oligómeros) no meio circundante [23].

A erosão dos polímeros pode ser classificada como erosão volúmica ou erosão de superfície. Na erosão volúmica, a cisão da cadeia do polímero ocorre ao longo a amostra. O peso molecular e a resistência mecânica das amostras tendem a diminuir ao longo do tempo. A redução do peso molecular ocorre essencialmente a partir do início do processo de degradação, enquanto que a perda de massa se trata de um processo mais retardado. Na erosão superficial, a perda de material é confinada apenas à superfície do dispositivo, pelo que o tamanho e a massa apresentam alguma redução ao longo do tempo logo desde o início, mas o peso molecular e as propriedades mecânicas do dispositivo polimérico permanecem inalterados. Também na erosão superficial, a taxa relativa à perda de massa é proporcional à área superficial [23].

O comportamento *in vitro* da degradação pode diferir consideravelmente da degradação *in vivo*. Na maioria dos casos, a degradação *in vivo* é mais rápida do que a degradação *in vitro* o que implica que a redução do peso molecular *in vivo* não seja apenas devido à degradação hidrolítica causada pelo fluido extracelular, mas provavelmente também devido à influência dos radicais livres de oxigénio e de outras espécies geradas pelas células inflamatórias. Para além do aumento na taxa de cisão da cadeia, a taxa de erosão *in vivo* é diferente da situação *in vitro*. A perda de massa *in vivo* pode ser baseada em qualquer um transporte passivo de monómeros e oligómeros de dissolução e difusão (semelhante a *in vitro*) ou pelo transporte activo por fagócitos ou uma combinação destes processos. Em síntese, a degradação *in vivo* de um polímero biodegradável é afectada por diversos factores, que são influenciados pelas características do dispositivo [23].

## 3.4. Caracterização das membranas

As membranas foram caracterizadas antes e após a degradação em meio biológico de modo a avaliar o grau de degradação ao longo do tempo. Para tal foi utilizada a técnica de SEM para avaliar a morfologia e estrutura.

### 3.4.1. Morfologia

A morfologia das membranas e respectivas fibras foram observadas por SEM (Microscopia Electrónica de Varrimento) e sempre que se justificou procedeu-se também à determinação da

composição numa zona micrométrica da amostra por EDS - Espectroscopia de difracção de electrões.

#### 3.4.1.1 Microscopia electrónica de varrimento (SEM)

De forma a observar a morfologia das fibras antes e depois da degradação, assim como a deposição de nanopartículas sobre estas, utilizou-se a microscopia electrónica de varrimento (SEM). Esta técnica permite uma melhor observação, devido à elevada resolução, da uniformidade da superfície das fibras. Para tal recorreu-se ao equipamento Zeiss DSM-962 existente no Cenimat/I3N.

Na microscopia electrónica de varrimento, um feixe de electrões de alta energia é enviado na direcção da amostra, o qual ao interaccionar com a superfície desta emite, entre outros, electrões secundários que são detectados por sensores específicos de alta resolução. Estes detectores convertem a medição da corrente devido aos electrões num sinal que é posteriormente transformado numa imagem [24].

#### ***Procedimento experimental***

Preparam-se pequenas amostras resultantes da electrofiação, antes e após o estudo da degradação, e também após a funcionalização com nanopartículas e polímeros condutores, sendo posteriormente colocadas num suporte adequado para o efeito. Por intermédio de uma fita de carbono foi possível estabelecer o contacto eléctrico entre a superfície das amostras e o suporte. Anteriormente à observação no microscópio é necessário revestir todas as amostras com uma película de ouro ou de carbono que possibilita o aumento do contraste da imagem e evita a acumulação de cargas na superfície da amostra.

#### 3.4.1.2 Microscopia electrónica de transmissão (TEM)

De forma a observar as dimensões das nanopartículas sintetizadas e respectivos diâmetros utilizou-se a microscopia electrónica de transmissão (TEM) devido às características de elevada resolução que apresenta em comparação com outros microscópios, resultado do pequeno comprimento de onda dos electrões emitidos pela fonte. O equipamento utilizado corresponde ao Microscópio Electrónico de Transmissão 200 kV (Hitachi H-8100 II) com emissão termiónica (LaB6) com resolução ponto a ponto de 2,7 Å, do Instituto Superior Técnico.

Na microscopia electrónica de transmissão, um feixe de electrões é emitido em direcção a uma amostra ultra fina, interagindo com esta enquanto a atravessa. A interação dos electrões transmitidos através da amostra forma uma imagem que é posteriormente ampliada e focada num dispositivo de imagem [24].

#### ***Procedimento Experimental***

Para analisar as amostras estas foram imersas em etanol e dispersas ultrasonicamente. De seguida, depositou-se uma gota desta suspensão sobre uma grelha de carbono iniciando-se a observação.

#### 3.4.1.3 Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica de análise térmica que regista o fluxo de energia calorífica associado a transições nos materiais em função da temperatura. É um método no qual a diferença no fornecimento de energia calorífica entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância em estudo e a referência são submetidas ao mesmo programa de aquecimento, ou arrefecimento, rigorosamente controlado.

Estas medidas fornecem dados qualitativos e quantitativos em processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) e exotérmicos (libertação de energia calorífica), permitindo obter informações referentes a alterações de propriedades físicas e/ou químicas como, por exemplo o grau de cristalinidade de um polímero, diagramas de fase, entalpias de transição de fase e de reacção, entre outros [25].

#### ***Procedimento Experimental***

A análise DSC foi realizada utilizando o equipamento NETZSCH STA 449F3 com amostras expostas a uma gama de temperaturas entre 20 a 200°C, cuja taxa de aquecimento foi de 10°C.min<sup>-1</sup>. Posteriormente utilizou-se o *software* NETZSCH Proteus para quantificar a temperatura e a entalpia de fusão para cada uma das amostras. A alteração da cristalinidade do material foi analisada comparando a entalpia de fusão de cada uma das amostras com uma amostra de PCL que não esteve sujeita a degradação em solução salina. Deve-se também salientar que as amostras foram todas testadas em duplicado para que os valores sejam mais fidedignos.

### 3.4.2. Propriedades Físico-Químicas

A composição das membranas antes e após a funcionalização com nanopartículas e pirrol foi analisada através de medidas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, enquanto que a variação da concentração de nanopartículas nas suspensões coloidais utilizadas foi observada através da variação dos espectros de transmitância obtidos por espectroscopia na gama de comprimentos de onda do visível.

#### 3.4.2.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizada para analisar a composição química das membranas produzidas assim como possíveis modificações que possam existir após o contacto destas com as soluções electrolíticas utilizadas. O equipamento empregue foi o espectrofotómetro FT-IR Nicolet 6700 – Thermo Electron Corporation com o acessório ATR existente no Cenimat/I3N.

Trata-se de uma técnica simples que permite obter, num curto espaço de tempo, informações relativas ao tipo de ligações químicas que existem num determinado composto. O espectro de infravermelho resultante ilustra a frequência de vibração dos grupos funcionais que estão presentes na amostra em análise. Neste espectro encontram-se as bandas de absorção ou transmissão que correspondem à frequência de vibração das ligações dos átomos que constituem o material, pelo que se torna possível identificar os grupos funcionais que estão presentes na amostra. É de salientar que o mesmo tipo de ligações pode apresentar mais do que uma frequência de vibração devido a vibrações de distensão e/ou deformação [26].

#### ***Procedimento Experimental***

Inicialmente realizou-se o “background”, que servirá de linha de base ao longo da aquisição dos espectros, sem a amostra estar inserida no respectivo suporte. Posteriormente procede-se então à colocação desta no porta-substratos dando-se início à aquisição para cada uma das amostras.

### 3.4.2.2 Espectroscopia de UV-Visível

A espectroscopia UV-Visível foi empregue para obter os espectros de absorção de cada uma das soluções coloidais de nanopartículas de ouro e prata sintetizadas durante o trabalho experimental. O equipamento usado foi o espectrofotómetro da marca PG Instruments, modelo T90+.

A espectroscopia UV-Visível trata-se de um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio activo de fármacos. Esta técnica consiste na utilização de radiação eletromagnética cujos comprimentos de onda podem variar de acordo com as características do equipamento. No caso do equipamento utilizado a gama de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) varia entre 200 a 900 nm. É obtido o espectro de transmitância ou absorvância de amostras sólidas ou líquidas desde que não absorvam completamente a radiação na gama de comprimentos de onda indicada [27, 28].

#### ***Procedimento Experimental***

Inicialmente efectuou-se a linha de base para a água, que vai ser utilizada como referência ao longo da aquisição dos espectros. No caso das suspensões de nanopartículas foi utilizada também a água, por ser o solvente das soluções coloidais. Posteriormente procedeu-se à diluição de cada uma das soluções e de seguida à colocação destas na cuvete, dando-se então início à aquisição do espectro para cada uma das soluções pretendidas.

### 3.4.3. Propriedades Eléctricas e Electroquímicas

As técnicas electroquímicas visam a determinação do potencial redox de um meio em contacto com um material/membrana e encontra uma ampla faixa de aplicações, incluindo a monitorização ambiental, o controlo de qualidade industrial e as análises biomédicas.

Os processos electroquímicos normalmente ocorrem na interface eléctrodo/solução. A diferença entre as diversas técnicas electroanalíticas reside na natureza do sinal eléctrico empregue. Para efectuar estas medições são necessários pelo menos dois eléctrodos (trabalho e referência) e a solução que contém a espécie electroactiva de interesse. Nas técnicas de voltametria é utilizado um terceiro eléctrodo denominado contra-eléctrodo ou eléctrodo-auxiliar.

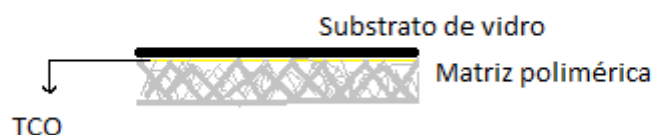
Os métodos de varrimento de potencial consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um potencial que varia ao longo do tempo, o que resulta na ocorrência de reacções de oxidação ou redução de espécies electroactivas na solução cuja energia libertada é convertida em electricidade [29, 30].

Por este motivo foram realizados estudos electroquímicos de modo a caracterizar o comportamento da membrana produzida. Através da técnica de voltametria cíclica é possível identificar o tipo de reacções que ocorrem no seio da estrutura polimérica, bem como os efeitos dos diferentes eléctrodos utilizados no comportamento electroquímico do dispositivo.

Assim, para a caracterização das propriedades eléctricas e electroquímicas deste trabalho, utilizou-se um potencióstato da Gamry Instruments (Reference 600).

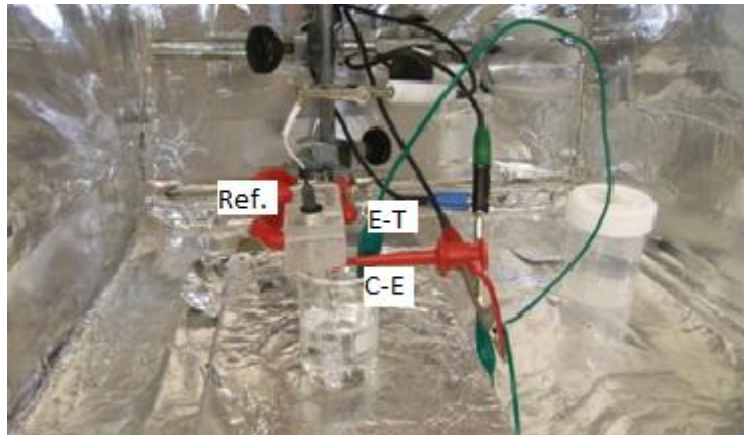
Durante os ensaios laboratoriais recorreu-se a dois sistemas diferentes para efectuar as medidas electroanalíticas, sendo que o primeiro apresenta configuração de três eléctrodos (configuração mais usual) e o segundo apenas dois.

Na primeira configuração de três eléctrodos um é o eléctrodo de referência (Ref.) neste caso Ag/AgCl, o contra-eléctrodo (C-E) um fio de platina e o eléctrodo de trabalho (E-T) é composto por um vidro, sendo uma das faces revestida por um TCO (óxido condutor transparente), e sobre a qual foi depositada a matriz polimérica (ver figura 3.2). Posteriormente procede-se à imersão destes eléctrodos na solução de interesse para que seja possível observar o comportamento electroquímico existente na interface eléctrodo/solução.



*Figura 3.2 Esquema simbólico da deposição da matriz polimérica sobre o eléctrodo de trabalho.*

Tal como se pode observar na figura seguinte, os ensaios foram realizados no interior de uma caixa de Faraday de forma a evitar interferências e a garantir uma maior fiabilidade dos resultados obtidos.



*Figura 3.3 Montagem experimental das células de medida de corrente eléctrica no interior da caixa de Faraday e respectivos eléctrodos: contra-eléctrodo (C-E), eléctrodo de referência (Ref.) e eléctrodo de trabalho (E-T).*

Na segunda configuração o eléctrodo de referência e o contra-eléctrodo estão ambos electricamente ligados formando um único eléctrodo. Desta forma, a tensão é aplicada entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência (que, consequentemente, também é o contra-eléctrodo) e a corrente é lida entre os mesmos utilizando a célula da figura 3.4.



*Figura 3.4 Célula electroquímica para medição da corrente eléctrica em amostras sólidas.*

A célula é formada por dois contactos circulares de ouro ( $\approx 0,8\text{cm}^2$ ), entre os quais se coloca a amostra impregnada com uma solução de 0,9% NaCl (p/p) ou SBF de forma a simular a influência dos fluidos biológicos.

A utilização desta configuração deve-se sobretudo ao facto de se tratarem de amostras no estado sólido com uma espessura bastante reduzida, o que por si só dificulta a utilização de um terceiro eléctrodo. Por outro lado, é também de salientar que este método evita uma possível degradação do TCO, causada pela aplicação de uma tensão e a consequente contaminação da amostra.



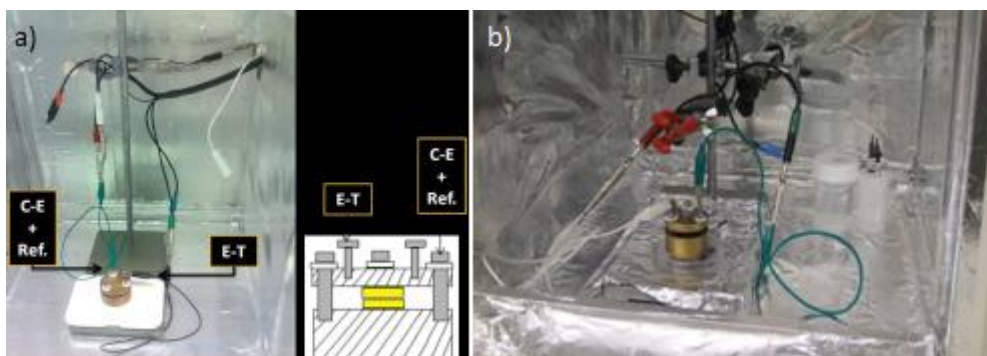


Figura 3.5 a) Montagem experimental da célula de medida de corrente eléctrica no interior da caixa de Faraday e respectivos eléctrodos: contra-eléctrodo (C-E), eléctrodo de referência (Ref.) e eléctrodo de trabalho (E-T); b) Esquema ilustrativo da célula electroquímica e respectiva indicação dos eléctrodos (adaptado de [9]).

### 3.4.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica que permite, de uma forma rápida e simples, detectar reacções electroquímicas, assim como avaliar a cinética da transferência de electrões em reacções redox. Define-se por reacção redox, uma reacção que envolve a transferência de electrões de uma espécie para a outra, implicando a coexistência de uma semi-reacção de redução (ganho de electrões) e de uma semi-reacção de oxidação (perda de electrões).

Esta técnica, ao contrário da *Linear Sweep Voltammetry*, permite fazer o varrimento do potencial em ambas as direcções. Tal facto torna-se vantajoso, na medida em que é possível detectar reacções reversíveis. A intensidade de corrente eléctrica,  $I$ , corresponde ao número de electrões que atravessa determinada secção de um circuito por unidade de tempo, isto é, o fluxo de carga eléctrica. Como cada electrão captado ou fornecido representa uma parte de uma reacção-redox, a intensidade da corrente eléctrica dá informações sobre a quantidade de electrões fornecidos devido a reacções redox [29, 30].

#### **Procedimento Experimental**

No programa de controlo do Gamry Instruments selecciona-se a aplicação *Cyclic Voltammetry* e de seguida efectuam-se diversos ensaios para as diferentes condições, escolhendo o valor para o número de ciclos do ensaio, a velocidade de varrimento e os limites do intervalo de tensão a aplicar, que no caso dos ensaios efectuados foram: *Scan Limits* [-1V a 1V]; *Scan Rate* [50 mV/s a 80mV/s]; *Step Size* [2mV]; *Cycles* [10 a 15]; *Max Current* [1 a 2mA]; *Electrode Area* [1,0 ±0,5 cm<sup>2</sup>].

### 3.4.3.2 Electrólitos

Os electrólitos (solução onde a membrana é imersa) utilizados na Voltametria Cíclica foram o soro fisiológico (0,9% NaCl em água (p/p)) e o SBF (*Simulated Body Fluid*).

O SBF surge actualmente descrito na literatura como mediador da avaliação da bioactividade de diversos materiais, incluindo polímeros [31, 32]. No entanto, esta solução foi utilizada nos ensaios electroquímicos devido à semelhança das suas concentrações iónicas com o plasma sanguíneo, comparativamente com o PBS utilizado para os estudos de biodegradação, tal como é ilustrado na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Comparação entre as concentrações iónicas do plasma humano e de soluções sintéticas [mM] [31];

Ião		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	pH
Concentração do Ião	SBF	142	6,5	1,5	2,5	148,0	4,2	1,0	0	7,4
	PBS	-	4,2	-	-	142,5	-	8.1	-	7,4
	Plasma Sanguíneo	142	5,5	1,0	2,6	107	27	1,54	1,0	7,4

A preparação do SBF requer um procedimento específico na preparação da solução quer ao nível da dissolução dos reagentes quer do ajuste de pH, assim como alguns cuidados a ter com a manutenção da solução, tal como se pode observar no procedimento experimental seguidamente apresentado.

#### ***Procedimento Experimental***

- **Dissolução dos reagentes**

Inicialmente adicionou-se cada um dos reagentes, após dissolução total, em 700ml de água ultra-pura, pela ordem indicada na tabela 3.4. De seguida, e após a adição do 9º reagente, aqueceu-se a solução desde a temperatura ambiente até aos 37°C [32].

- **Ajuste do pH**

Após a estabilização da temperatura da solução verifica-se qual o valor de pH, que se deve encontrar entre 8 a 8,5, sendo por isso necessário adicionar HCl (1M) até que o valor estabilize por volta dos 7 a 7,4 e a solução se apresente completamente translúcida. Após o ajustamento de pH deve-se ajustar o volume total da solução para 1000 ml adicionando-se água ultra-pura. Posteriormente é necessário manter a solução à temperatura ambiente para que haja um arrefecimento lento antes da colocação da mesma num frigorífico a uma temperatura entre os 5 e os 10°C. Por outro lado, deve-se também salientar que esta solução se mantém estável apenas durante um mês, caso ocorra precipitação a solução já não deverá ser utilizada [32].

Tabela 3.4 Reagentes utilizados na preparação da solução de SBF;

Ordem	Reagente	Quantidade [g/l]	Ião	SBF [mM]	Marca
1º	NaCl	6,547	Cl <sup>-</sup> ; Na <sup>+</sup>	142	Panreac
2º	NaHCO <sub>3</sub>	2,268	Na <sup>+</sup> ; HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	125	Merck
3º	KCl	0,373	K <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	27	Panreac
4º	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,178	Na <sup>+</sup> ; HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5	Fulka
5º	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,305	Mg <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	1,5	Sigma-Aldrich
6º	1M HCl	0,15	H <sup>+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	2,5	Panreac
7º	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,368	Ca <sup>2+</sup> ; Cl <sup>-</sup>	1	Sigma-Aldrich
8º	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071	Na <sup>+</sup> ; SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	Panreac
9º	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057			Alfa Aesar
10º	1M HCl	Titular até pH 7,4 a 37°C			

### 3.4.3.3 Condutividade Eléctrica (Curvas I-V)

De forma a determinar a condutividade dos materiais em estudo (separador e eléctrodos) utilizou-se um traçador de Curvas IV (4145B Semiconductor Parameter Analyser, existente no DCM)

Da curva IV, calculando o declive da recta que se obtém (comportamento óhmico) determina-se o valor da resistência (R) do material a partir do qual se pode calcular a condutividade ( $\sigma$ ) através da equação seguinte:

$$\sigma = \frac{l}{R.S}$$

Onde,  $S$  representa a secção atravessada pela corrente (espessura  $\times$  largura) e  $l$  o comprimento.

#### ***Procedimento Experimental***

Um pedaço da membrana foi fixado com cola de prata a dois eléctrodos de Al depositados sobre vidro. As pontas de prova do equipamento foram colocadas sobre a cola de prata (em contacto com os eléctrodos de Al). Foi realizado um varrimento de tensão entre -50V e +50V e registada a corrente.



*Figura 3.6 Equipamento utilizado para efectuar as medições relativas à condutividade eléctrica.*

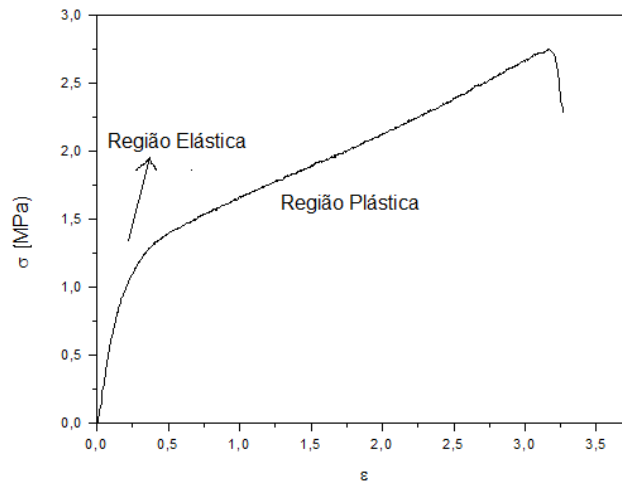
#### **3.4.4. Propriedades Mecânicas**

As propriedades mecânicas das membranas produzidas foram determinadas através de ensaios de tracção. Os ensaios de tracção consistem na aplicação de uma força na membrana, provocando-lhe um estiramento até à rotura. A carga aplicada bem como a respectiva extensão do material devem assim ser registadas, para que se possa construir o gráfico da tensão em função da extensão, a partir do qual se obtém o valor do Módulo de Young [33].

A figura 3.7 representa uma curva típica de um material polimérico, onde os diferentes tipos de deformação se encontram referenciados. Na zona elástica, o material assume o formato inicial ao se remover a carga aplicada podendo-se assim aplicar a lei de Hooke, dada pela expressão seguinte:

$$\sigma = E \times \varepsilon$$

Onde  $\sigma$  é a tensão,  $E$  o módulo de Young e  $\varepsilon$  a deformação.



*Figura 3.7 Curva de tracção mecânica típica de um material polimérico.*

O módulo de Young é um parâmetro indicativo da resistência de um material à deformação elástica fornecendo indicações acerca da rigidez do material. A unidade utilizada é o Pascal [33].

A tensão é determinada pela força,  $F$ , a dividir pela secção da amostra,  $S$ . A deformação obtém-se através da divisão do alongamento ( $\Delta l$ ) da amostra pelo comprimento inicial,  $l_0$ , pelo que o módulo de Young pode assim ser determinado através da seguinte equação.

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} = \frac{\frac{F}{S}}{\frac{\Delta l}{l_0}}$$

#### ***Procedimento Experimental***

As amostras preparadas apresentam uma forma rectangular, cujas dimensões são de 3x1 cm, aproximadamente. Antes de se iniciar o processo de testes procedeu-se à medição, com um micrómetro, da espessura de cada uma das amostras. É de salientar também que os ensaios de tracção foram efectuados a uma velocidade de 5mm/min e à temperatura ambiente.

O equipamento utilizado nos testes é uma máquina de tracção Reometric Scientific controlada por um programa Minimat Control Software.



Figura 3.8 (a) Equipamento para realização dos testes de tracção; (b) tracção de uma amostra.

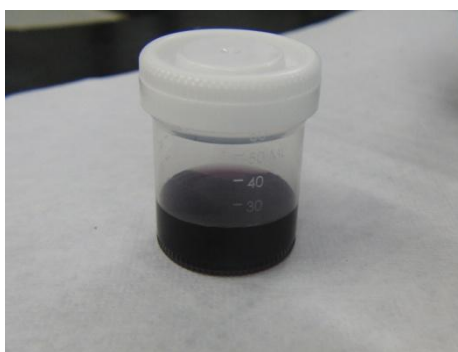
### 3.5. Produção e caracterização dos eléctrodos

A produção dos eléctrodos é uma das etapas mais importantes deste trabalho uma vez que estes devem ser concebidos de forma a melhorar e a garantir a produção de energia auto-suficiente por parte das biobaterias. Neste trabalho os eléctrodos são formados por intermédio da funcionalização do PCL com nanopartículas metálicas e polímeros condutores através de electrofiação e também através de processos electroquímicos como a Voltametria Cíclica, onde se efectua uma electrodeposição destes compostos nas membranas produzidas. Para a caracterização dos eléctrodos foram utilizadas técnicas como o SEM, o FT-IR, a microscopia óptica de fluorescência (Microscópio Olympus BX-51 – Fonte X-Cite Series 120 Q) e também processos eléctricos e electroquímicos como as Curvas I-V e a Voltametria Cíclica. Relativamente às nanopartículas sintetizadas foram também caracterizadas por Espectroscopia UV-Visível e TEM.

#### 3.5.1. Síntese de Nanopartículas de Ouro

Inicialmente preparam-se duas soluções, a primeira de  $\text{HAuCl}_4$  (1mM, AnalaR NORMAPUR) em 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  e a segunda de Citrato de Sódio (38,8Mm, AnalaR NORMAPUR) em 10ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente aqueceu-se até à ebulição a solução correspondente à fonte de ouro e adicionou-se 2ml de agente redutor. Após a adição do citrato de sódio manteve-se a temperatura e a agitação durante, aproximadamente, 10 minutos perfazendo o volume em falta com a adição de água destilada [34].

Primeiramente a solução apresenta uma tonalidade incolor, no entanto após a adição do agente redutor esta começa a apresentar um tom avermelhado devido à aglomeração das partículas e consequente aumento do seu tamanho.

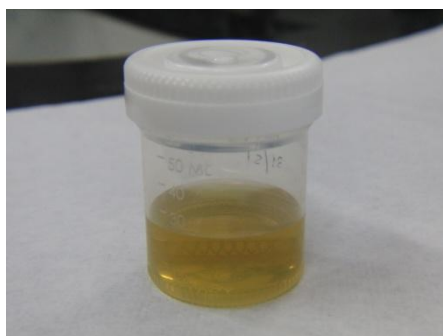


*Figura 3.9 Imagem da solução de nanopartículas de ouro.*

### 3.5.2. Síntese de Nanopartículas de Prata

Preparam-se duas soluções, a primeira de  $\text{AgNO}_3$  (0,001M, Riedel-de-Haen) em 50 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  e a segunda de Citrato de Sódio (38,8mM, AnalaR NORMAPUR) em 10ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente aqueceu-se novamente até à ebulição a solução correspondente ao nitrato de prata e adicionou-se 1 ml de agente redutor. Após a adição do mesmo manteve-se a temperatura e a agitação suave durante 90 minutos, tempo após o qual a solução deve arrefecer naturalmente [35].

Inicialmente a solução apresenta uma tonalidade incolor, no entanto após a adição do agente redutor esta começa a apresentar um tom amarelado devido à aglomeração das partículas e consequente aumento do seu tamanho.



*Figura 3.10 Imagem da solução de nanopartículas de prata.*

### 3.5.3. Funcionalização do PCL com Nanopartículas de Ouro e de Prata

Inicialmente utilizaram-se 3 ml de solução de nanopartículas sintetizadas anteriormente, procedendo-se à sua centrifugação até ocorrer sedimentação no microtubo (10000rpm durante 10 min). Posteriormente removeu-se a água em excesso deixando apenas as

nanopartículas que sedimentaram e adicionou-se 1 ml de acetona (Sigma-Aldrich) em cada um dos microtubos. Preparou-se a solução de 13% PCL com NPs (m/m) deixando-se em agitação durante, aproximadamente, 2h com uma temperatura entre os 35 e os 40°C, para que o polímero seja totalmente dissolvido.

#### 3.5.3.1 Electrofiação da membrana de PCL com Nanopartículas

As soluções foram então utilizadas no processo de electrofiação utilizando as seguintes condições: Solução de 13% PCL com NPs (m/m); Seringa de 4,30mm (1ml); Agulha de calibre 23; Distância ao alvo de 15cm; Tensão de 15kV; Humidade de 55%; Temperatura de 21,5°C e um alvo estático.

#### 3.5.3.2 Electrodeposição das Nanopartículas

De forma a depositar as nanopartículas de Ouro e Prata nas membranas poliméricas produzidas utilizou-se a técnica de Voltametria Cíclica com o sistema de três eléctrodos, cujo eléctrodo de trabalho (E-T) se trata de um substrato de vidro onde foi produzida a membrana polimérica. Posto isto procedeu-se à imersão do conjunto de eléctrodos nas respectivas soluções de nanopartículas dando-se início ao processo de electrodeposição para cada uma delas.

#### 3.5.4. Funcionalização do PCL com Pirrol (Py)

A solução de PCL ( $M_n \approx 80,000$ , Sigma-Aldrich) com 10% de pirrol (Py) (v/v) (Fulka) foi mantida em agitação magnética durante, aproximadamente, três horas, para que posteriormente se possa fazer electrofiação da mesma.

##### 3.5.4.1 Electrofiação da membrana de PCL com Py

A electrofiação das fibras foi realizada nas seguintes condições: solução de PCL com 10% Pirrol (v/v); Seringa de 4,30mm (1ml); Agulha de calibre 21; Distância ao alvo de 10cm; Tensão de 15kV; Humidade entre os 30 a 40%; Temperatura de 23°C e alvo rotatório.



#### 3.5.4.2 Electrodeposição do Polipirrol (PPy)

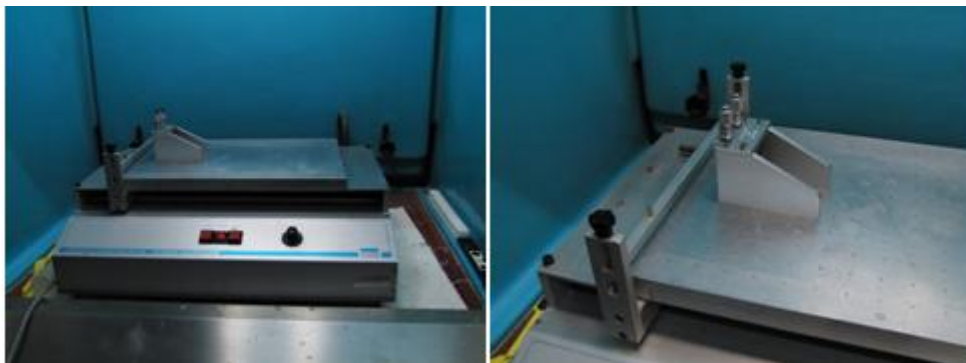
Antes de se proceder à electrodeposição do polímero condutor sobre a membrana produzida procedeu-se à electropolimerização do mesmo através da produção de uma solução de 10mM de Py com 10mM de PBS, que medeia a formação do Polipirrol [36]. De seguida, utilizou-se a técnica de Voltametria Cíclica com o sistema de três eléctrodos, cujo eléctrodo de trabalho (E-T) se tratava também de um substrato de vidro sobre o qual foi produzida a membrana polimérica. Posteriormente procedeu-se à imersão do conjunto de eléctrodos na solução preparada anteriormente dando-se início ao processo de electrodeposição.

#### 3.5.5. Produção de filmes

Para além das membranas produzidas por electrofiação foram também produzidos filmes utilizando as mesmas soluções a fim de comparar as propriedades das membranas porosas com os filmes compactos. Os filmes foram produzidos pelo método de espalhamento com recurso a um equipamento (Automatic Film Applicator - Braive Instruments) que permite obter filmes com espessura homogénea.

##### ***Procedimento Experimental***

Os filmes foram colocados em cima de uma placa de vidro e a sua produção consistiu na colocação de uma porção de solução à frente de uma régua de Gardner calibrada. Este equipamento faz deslocar a régua a uma velocidade constante, espalhando a solução de modo a formar o filme (ver figura 3.11).



*Figura 3.11 Imagens da máquina utilizada na produção de filmes e respectiva régua Gardner.*

## Capítulo 4. Análise dos Resultados

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

Procedeu-se ao estudo da biodegradação das membranas numa solução salina (PBS), estimando-se a perda de massa ao longo do tempo para que se possa aferir quanto à sua aplicabilidade em dispositivos implantáveis. Por outro lado, realizaram-se também testes de caracterização das membranas antes e após biodegradação.

Efectuou-se uma análise das propriedades mecânicas através da realização de ensaios de tracção para membranas antes e após a degradação em meio salino.

Os eléctrodos produzidos foram caracterizados tendo-se analisado o comportamento eléctrico e electroquímico do dispositivo.

### 4.1. Estudo da degradação das membranas de PCL em PBS

A análise da perda de massa das membranas de PCL numa solução salina semelhante aos fluídos biológicos foi avaliada tendo em vista a sua aplicabilidade na área da Biomédica, principalmente ao nível dos biodispositivos implantáveis e biodegradáveis. Este estudo decorreu ao longo de dez semanas, retirando-se e pesando uma das membranas de duas em duas semanas.

#### 4.1.1. Perda de massa

Relativamente à perda de massa das membranas de PCL após imersão em PBS durante dez semanas pode-se afirmar que os resultados sugerem um mecanismo de erosão volúmica, uma vez que até às seis semanas não se verifica qualquer perda de massa e após oito semanas em meio salino as membranas apresentaram uma perda de 9,33% e após dez semanas uma perda de 10,11%, relativamente à massa inicial tal como se ilustra na figura 4.1. No entanto, este estudo deveria ter sido prolongado durante mais tempo para que se pudesse ter um maior intervalo de valores e ir ao encontro do tempo médio de degradação já estudado para o PCL.

Tabela 4.1 Dados relativos à perda de massa de membranas com 2h de deposição e espessuras na ordem dos 0,050mm;

Tempo de degradação (semanas)	Massa Inicial – mi (mg)	Massa Final – mf (mg)	$\Delta m = mf - mi$ (mg)
2	7,9	7,9	0
6	12,5	12,5	0
8	15,0	13,6	1,4
10	16,8	15,1	1,7

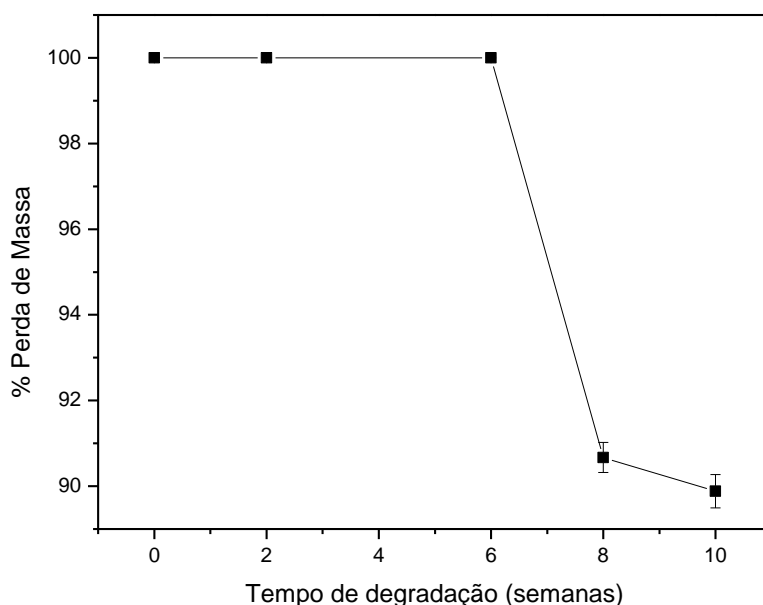


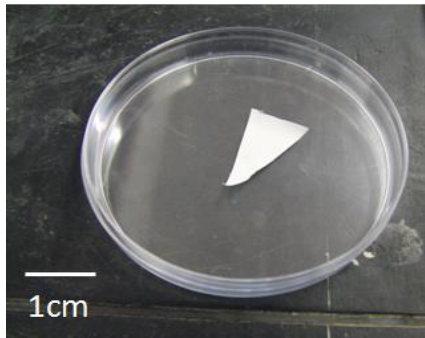
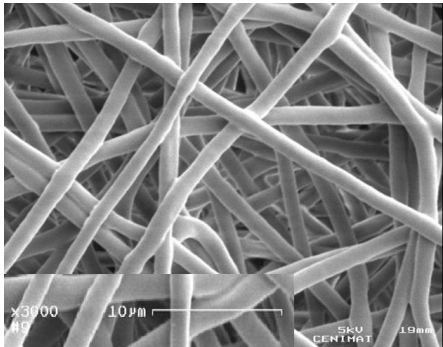
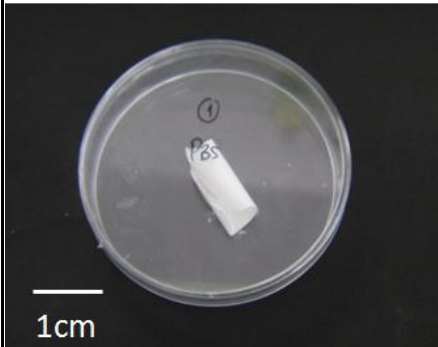
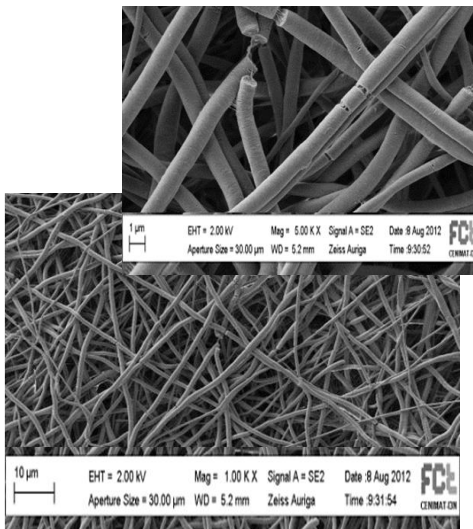
Figura 4.1 Gráfico da percentagem de perda de massa das membranas de PCL em função do tempo de imersão em PBS.

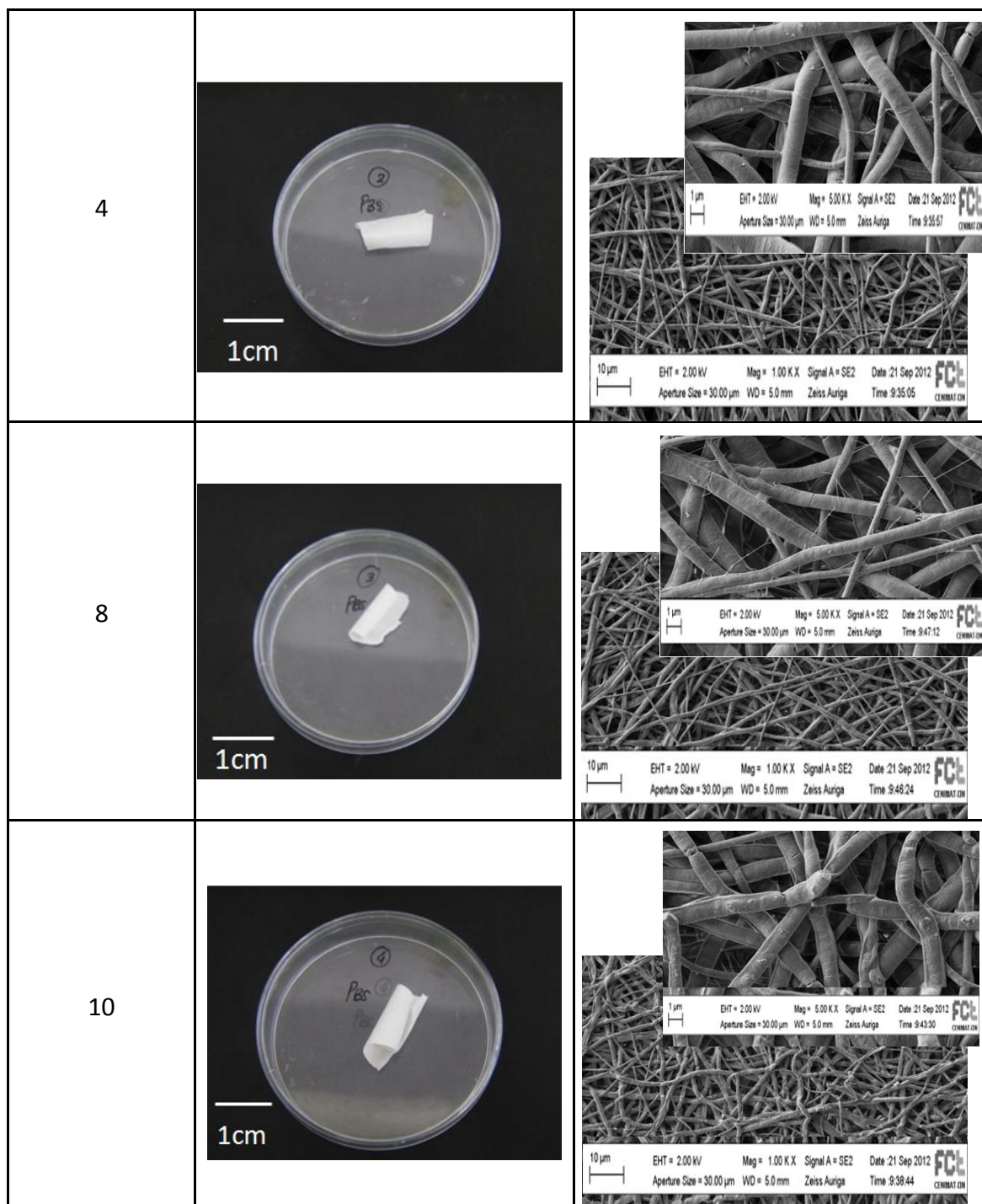
Segundo estudos já publicados, a taxa de degradação do PCL varia de acordo com a sua estrutura e formações morfológicas assim como a área de superfície em relação ao volume. Bolgen et. al [37] constatou que amostras com uma maior área de superfície em relação ao volume degradam mais rapidamente devido a uma maior penetração de água para dentro da amostra, iniciando o aumento das taxas de quebra da cadeia aleatória de grupos éster por intermédio de hidrólise.

## 4.1.2. Morfologia

### 4.1.2.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Tabela 4.2 Imagens SEM e fotografias das membranas de PCL (espessura de 0,050mm) após biodegradação em PBS;

Tempo de Degradação em PBS (semanas)	Fotografia das membranas	Imagem SEM das membranas
0		
2		



A análise das imagens da tabela 4.2 evidencia a ausência de alterações na superfície das fibras. Por outro lado, é também possível averiguar que ao longo do tempo de degradação as dimensões exteriores das amostras permaneceram praticamente inalteradas não sendo observadas alterações visuais na superfície das membranas, o que parece mais uma vez corroborar a existência de erosão volúmica nas membranas de PCL [37].

### 4.1.3. Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

A variação de massa das amostras de PCL com a variação da temperatura, obtidos através dos ensaios de DSC para uma membrana de PCL (de espessura 0,050mm) sem degradação e depois de imersa 4 semanas em PBS, está representada nas figuras 4.2 a) e b) respectivamente. Na tabela 4.3 estão representados os valores da temperatura de fusão e entalpia de fusão das membranas imersas durante várias semanas em PBS. Ao longo das semanas de degradação há um aumento da entalpia de fusão e da temperatura de fusão, o que revela um aumento da cristalinidade das fibras, o que pode dever-se a um possível ataque hidrolítico dentro das regiões amorfas do polímero, e consequente rearranjo de cadeias de forma a criar uma estrutura mais ordenada [23].

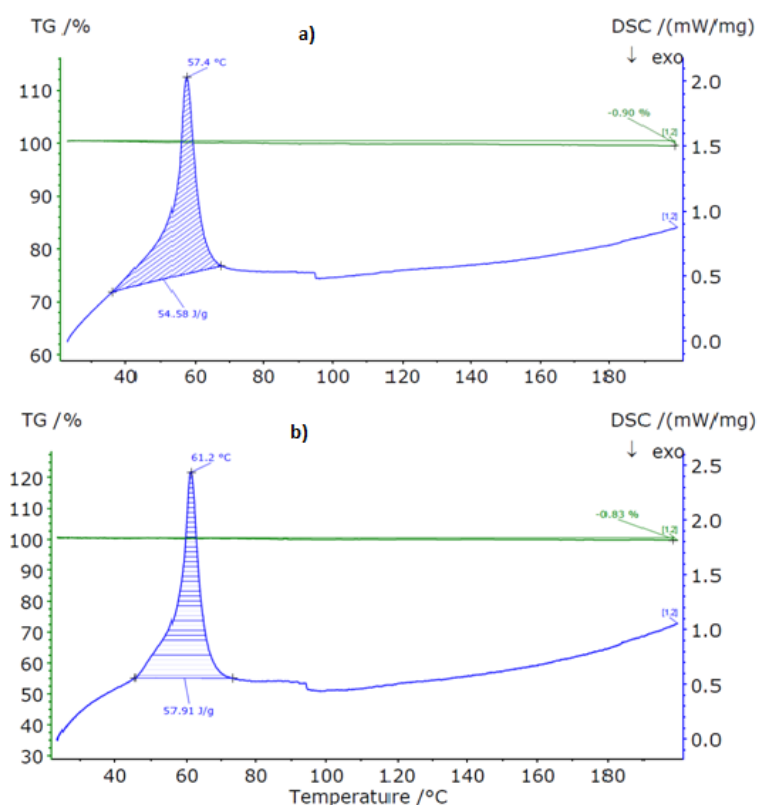


Figura 4.2 Análise DSC para duas amostras de PCL diferentes, onde se observa a variação da Temperatura e Entalpia de Fusão com o tempo de degradação; a) Amostra de PCL não sujeita a biodegradação; b) Amostra de PCL após 4 semanas em solução salina (PBS).

*Tabela 4.3 Dados relativos à Temperatura e Entalpia de Fusão obtidos para as membranas de PCL após biodegradação.*

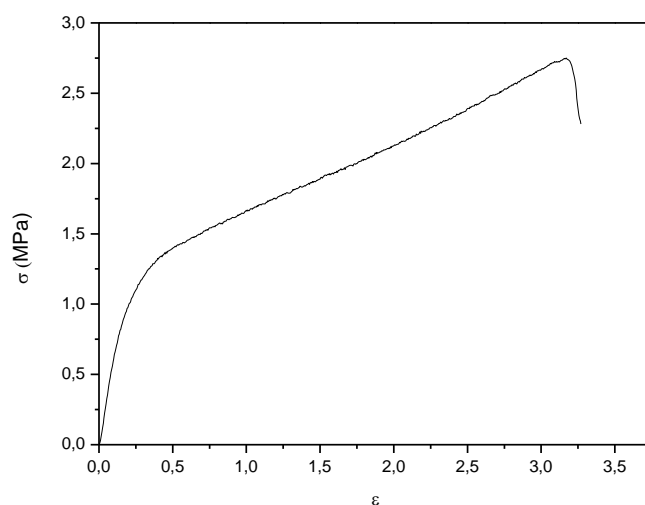
Tempo de degradação (semanas)	Temperatura de fusão (°C)	Entalpia de Fusão (J/g)
0	57,4	54,58
2	60,6	57,09
4	61,2	57,91
10	61,7	60,44

#### 4.1.4. Propriedades Mecânicas

Para realizar estes ensaios foram recolhidas dez amostras de membranas de PCL produzidas por electrofiação, antes de iniciar o estudo da degradação e quatro amostras após dez semanas imersas num meio tampão salino, de forma a analisar a evolução das propriedades mecânicas da membrana antes e após a biodegradação.

##### 4.1.4.1 Ensaio de tracção

Na figura 4.3 apresenta-se a curva de tracção típica das membranas de PCL, evidenciando zonas de deformação elástica e plástica. A partir destas curvas foram determinados o módulo de Young, tensão de cedência e tensão de rotura das membranas. Os valores médios e desvios padrão determinados para os parâmetros mecânicos apresentam-se na tabela 4.4.



*Figura 4.3 Curva de tracção típica obtida para amostras com cerca de 0,050mm de espessura.*

*Tabela 4.4 Valores médios e desvios padrão determinados para os parâmetros mecânicos.*

	<b>Parâmetros</b>	<b>Módulo Young (MPa)</b>	<b>Tensão Cedência (MPa)</b>	<b>Tensão Ruptura (MPa)</b>
Antes da colocação em meio salino	<b>Média</b>	9	0,9	2,61
	<b>Desvio Padrão</b>	2	0,3	0,07
Após colocação em meio salino	<b>Média</b>	10	1,2	2,8
	<b>Desvio Padrão</b>	4	0,3	0,5

Da análise dos resultados é possível verificar que as amostras apresentam um módulo de Young de 9MPa. Visto que o biodispositivo a desenvolver pode vir a ser implantado subcutaneamente, estes valores devem ser comparados com valores relativos a tecidos moles ou pele. Desta forma, sabe-se da literatura que a pele humana se trata de um tecido complexo que consiste em várias camadas distintas, apresentando cada uma os seus componentes e estrutura característica. Estudos prévios mostraram também que a pele se comporta como um material viscoelástico, não-homogêneo e anisotrópico que é constantemente submetido a vários esforços ou cargas, cujos valores de módulo de Young se encontram entre os 2 e os 8MPa dependendo da idade da pessoa, o que vai ao encontro dos valores obtidos para as membranas de PCL tornando-se assim possível a implementação destas membranas no organismo humano [38, 39, 40].

Após imersão em PBS verificou-se que ocorreu um ligeiro aumento da rigidez do material (aumento do módulo de Young), o que pode ser justificado com o aumento da cristalinidade das amostras ao longo do tempo de biodegradação. Contudo, a diferença de valores não é significativa em termos estatísticos, verificando-se, inclusive, que o desvio padrão dos valores do módulo de Young é consideravelmente superior. Verifica-se, igualmente, que a tensão de cedência e a tensão de ruptura diminuem após imersão em meio salino.

## 4.2. Funcionalização das membranas de PCL

Na tentativa de produção de elétrodos condutores e biocompatíveis, as membranas de PCL foram funcionalizadas com nanopartículas de Au e Ag. No subcapítulo que se segue apresentam-se esses resultados.



### 4.2.1. Nanopartículas de Ouro e Prata

As nanopartículas de Au e Ag foram sintetizadas de acordo com o procedimento descrito em 3.5.1 e 3.5.2 sendo as nanofibras produzidas de acordo com o procedimento referido em 3.5.3.

#### 4.2.1.1 Caracterização das Nanopartículas de Ouro

As características das nanopartículas de Au introduzidas nas membranas de PCL estão indicadas nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6. A figura 4.4 mostra o espectro de transmitância onde se pode observar o pico de absorção a cerca 520nm, apresentando um pico alargado que é relativo à formação de aglomerados de nanopartículas. No entanto pode-se constatar, através do gráfico da figura 4.4 que estas possuem dimensões reduzidas uma vez que o seu pico característico se encontra entre os 500 e os 550nm, o que indica que a sua absorção à luz se encontra na parte azul-verde do espectro resultando daí a tonalidade vermelho escuro, característica destas soluções. As imagens TEM (figura 4.5) mostram a existência de aglomerados, estando de acordo com os resultados de absorvância. Este aglomerados provocam variações na ressonância de *plasmon* e, conseqüentemente as partículas de maiores dimensões pelo que a ressonância de *plasmon* associada aos comprimentos de onda de absorção mudará de azul para vermelho, e luz reflectida de vermelho para azul alterando a tonalidade da solução de vermelho para azul. No que se refere aos diâmetros das nanopartículas verifica-se alguma heterogeneidade nos mesmos, variando estes entre os 12 e os 28nm. Contudo pode-se observar através do histograma (figura 4.6) que os valores com maior frequência ocorrem para diâmetros entre os 16 e os 18nm.

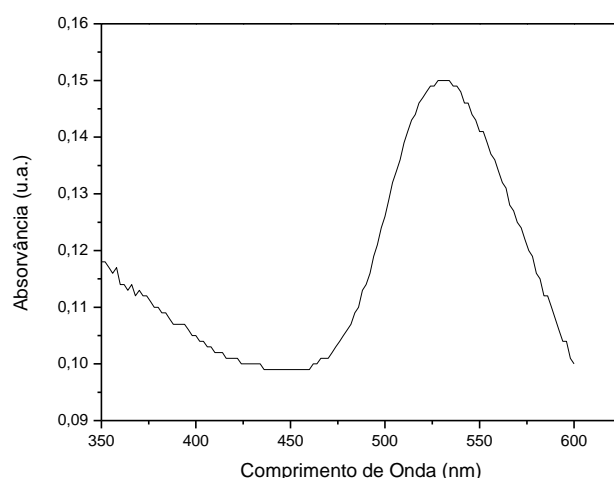


Figura 4.4 Espectro de absorvância das nanopartículas de Ouro.

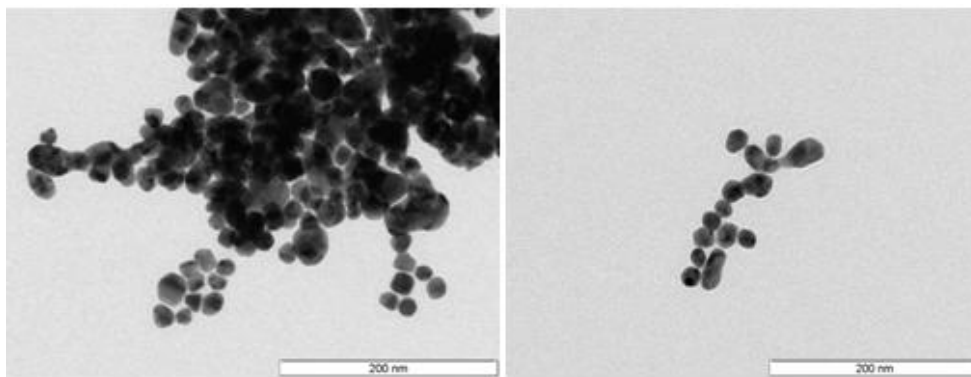


Figura 4.5 Imagens TEM das Nanopartículas de Ouro.

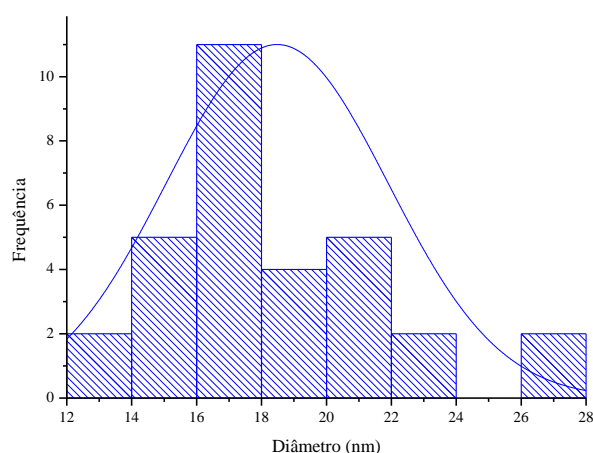


Figura 4.6 Histograma relativo à medição dos diâmetros para as Nanopartículas de Ouro a partir das imagens de TEM.

#### 4.2.1.2 Caracterização das Nanopartículas de Prata

As figuras 4.7, 4.8 e 4.9 mostram respectivamente o espectro de absorvância das nanopartículas em solução coloidal de água, as imagens de TEM e a distribuição do tamanho de grão obtido a partir das imagens de TEM. Pode afirmar-se que as nanopartículas produzidas possuem um pico de absorção para comprimentos de onda na ordem dos 420 nm, tal como era esperado teoricamente, que corresponde à ressonância de *plasmon* de superfície para estas nanopartículas. Relativamente às imagens TEM obtidas, observa-se uma maior dispersão das mesmas, comparativamente com as de Au, assim como uma grande variação de diâmetros, que oscilam entre os 5 e os 45 nm, apresentando no entanto uma maior frequência, aqueles que se encontram entre os 20 e os 30 nm.

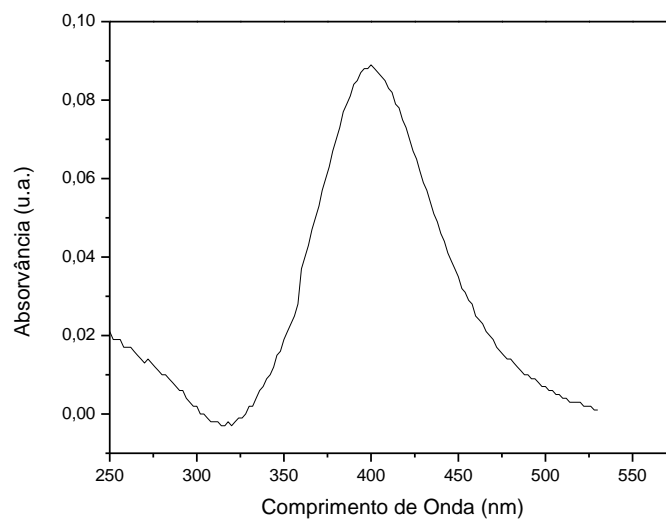


Figura 4.7 Espectro de absorvância das nanopartículas de Prata.

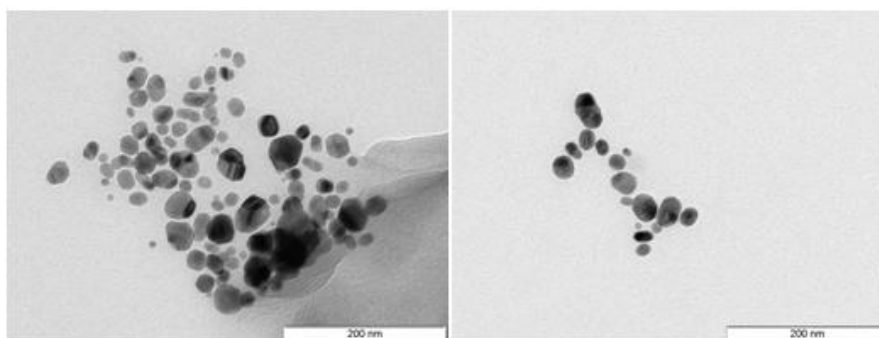


Figura 4.8 Imagens TEM das Nanopartículas de Prata sintetizadas.

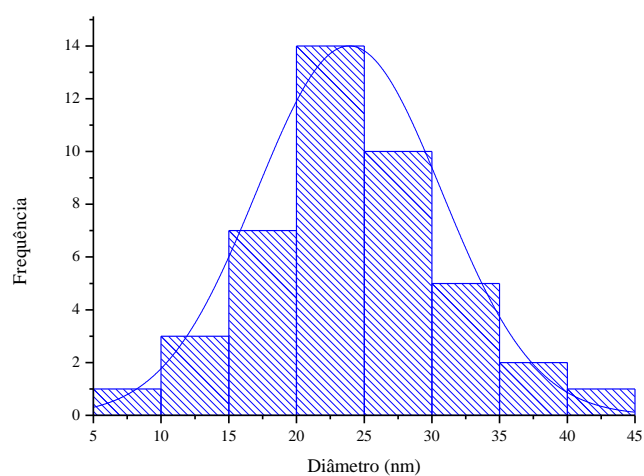


Figura 4.9 Histograma dos diâmetros das Nanopartículas de Prata, obtidos a partir das imagens de TEM.

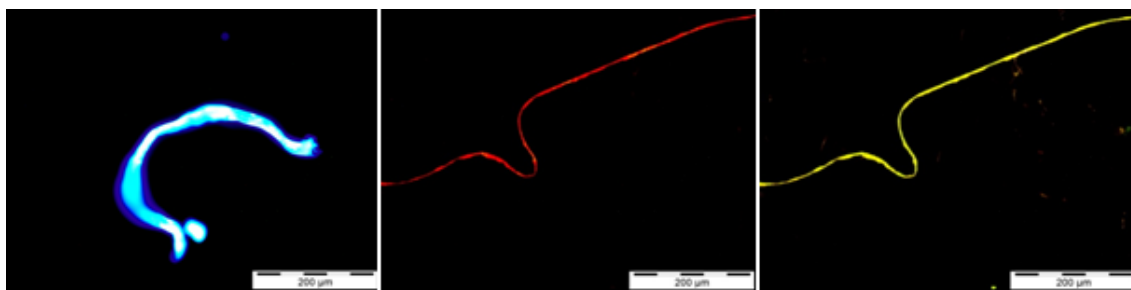
As nanopartículas acima referidas foram introduzidas nas fibras de PCL utilizando o procedimento referido em 3.5.3. Tendo em conta que as nanopartículas possuem uma

estrutura básica que é constituída por um núcleo central que define propriedades de fluorescência, ópticas, magnéticas e electrónicas da partícula, procedeu-se a uma averiguação, através de microscopia óptica de fluorescência, acerca da sua presença nas membranas poliméricas produzidas por electrofiação.

### 4.2.2. Fotoluminescência

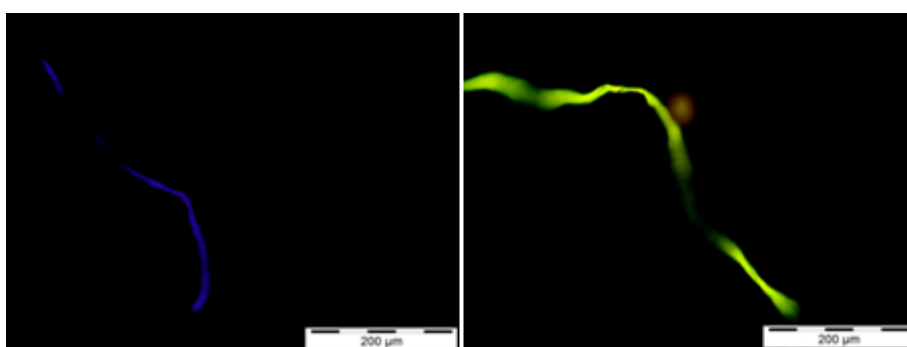
A fotoluminescência foi observada através de um microscópio óptico acompanhado de um acessório para fluorescência, com comprimentos de onda de excitação de 15-400nm (UV), 440-490nm (azul) e 520-570 nm (verde).

#### 4.2.2.1 Membranas de PCL funcionalizadas com nanopartículas de Ouro



*Figura 4.10 Fibras de PCL com NPs de Ouro observadas ao microscópio óptico de fluorescência para comprimentos de onda na gama do UV, verde e azul, respectivamente.*

#### 4.2.2.2 Membranas de PCL funcionalizadas com nanopartículas de Prata



*Figura 4.11 Fibras de PCL com NPs de Prata observadas ao microscópio óptico de fluorescência para um comprimento de onda na gama do UV e do azul, respectivamente.*

As figuras 4.10 e 4.11 confirmam a fotoluminescência das fibras de PCL produzidas com nanopartículas de ouro e prata, respectivamente. Sem nanopartículas as fibras não apresentam qualquer luminescência. Contudo deve-se salientar que este método deverá ser

otimizado num futuro trabalho experimental uma vez que não foi possível obter uma membrana totalmente fluorescente mas apenas algumas fibras.

Os filmes densos de PCL com nanopartículas de Ouro e Prata não apresentaram qualquer tipo de fotoluminescência nos três comprimentos de onda de excitação. Tal pode ser justificado tendo em conta que existe uma maior quantidade de polímero comparativamente com as nanopartículas quando ocorre o espalhamento da solução, o que resulta também numa maior dispersão das mesmas.

### 4.3. Caracterização dos eléctrodos

Tendo em consideração a aplicação das membranas produzidas em dispositivos electroquímicos, foram depositados eléctrodos com potenciais electroquímicos diferentes em ambas as faces da membrana produzida. Visto que há uma diferença de potencial entre os eléctrodos, vai criar-se um campo eléctrico que induz a migração de cargas no interior da membrana. Os materiais utilizados assim como as possíveis combinações entre estes vão influenciar as características electroquímicas do dispositivo.

Visto existirem diversos factores cruciais a ter em conta na escolha dos materiais que constituem os eléctrodos (ânodo e cátodo), tais como a biocompatibilidade e a biodegradabilidade torna-se necessário garantir que os materiais não provoquem qualquer reacção ao organismo para além da realização de estudos electroquímicos.

#### 4.3.1. Propriedades Físico-Químicas

##### 4.3.1.1 FT-IR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

O espectro da figura 4.12 mostra o tipo de ligações presentes na estrutura da membrana de PCL, da membrana funcionalizada com nanopartículas e da membrana funcionalizada com polipirrole.

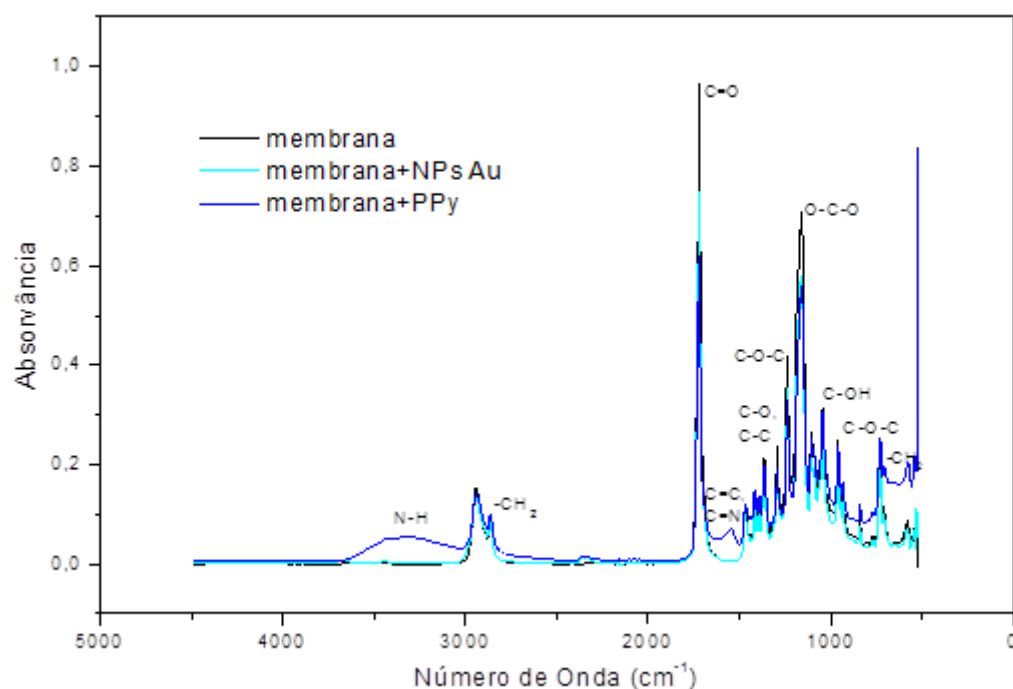


Figura 4.12 Espectro de infravermelho obtido para a membrana de PCL e para a membrana de PCL funcionalizada com NPs e PPy.

Na tabela seguinte são apresentados os valores das bandas e os grupos funcionais associados à membrana de PCL.

Tabela 4.5 Número de onda correspondente ao tipo de vibração e ligação presentes na membrana de PCL.

Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupos
2943	Distensão assimétrica $\text{CH}_2$
2865	Distensão simétrica $\text{CH}_2$
1720	Distensão $\text{C}=\text{O}$ (carbonilo)
1293	Distensão $\text{C}-\text{O}$ , $\text{C}-\text{C}$ (éster)
1238	Distensão assimétrica $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (éster)
1180	Distensão $\text{O}-\text{C}-\text{O}$ (éster)
1045	Distensão $\text{C}-\text{OH}$ (álcool primário)
960	Distensão simétrica $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (éster)
731	Deformação $\text{CH}_2$

A  $2943 \text{ cm}^{-1}$  identificam-se as bandas características das vibrações de distensão das ligações  $\text{C}-\text{H}$  alifáticas. O grupo carbonilo surge a  $1720 \text{ cm}^{-1}$ , caracterizado pela banda referente às vibrações de distensão da ligação  $\text{C}=\text{O}$ . A  $1293 \text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda característica da distensão das ligações  $\text{C}-\text{O}$  e  $\text{C}-\text{C}$  típica dos esteres e a  $1238 \text{ cm}^{-1}$  a banda da distensão

assimétrica das ligações C-O-C. Por fim, a  $1045\text{ cm}^{-1}$  é identificada a vibração de distensão da ligação C-OH, característica dos álcoois primários [26].

Através da comparação do espectro de infravermelho obtido para a membrana de PCL com o espectro obtido para a membrana de PCL funcionalizada com NPs quer de Ouro quer de Prata verifica-se que não houve quaisquer alterações, o que sugere que as nanopartículas apenas se depositam sobre as fibras da membrana sem haver qualquer interacção física ou química entre estas, tal como se pode observar na imagem SEM colocada no sub-capítulo seguinte. Por outro lado, no espectro infravermelho relativo à membrana de PCL funcionalizada com PPy verifica-se o aparecimento de novos picos correspondentes a ligações e vibrações diferentes daqueles que já se identificaram para a membrana de PCL. Assim, na região de  $3600$  a  $3200\text{ cm}^{-1}$  identificou-se a banda característica da distensão do grupo N-H. A  $1600\text{cm}^{-1}$  não foi possível detectar com nitidez a banda fraca atribuída à elongação do grupo C=C mas para os  $1456\text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente, observou-se uma banda associada ao estiramento do grupo C=N. Estas bandas são características do PPy [18].

### 4.3.2. Propriedades eléctricas e electroquímicas

#### 4.3.2.1 Voltametria Cíclica

- **Configuração com três eléctrodos**

Na figura 4.13 mostram-se os voltamogramas obtidos para a membrana imersa numa solução de SBF e para a membrana após electrodeposição de PPy por Voltametria Cíclica, seguida também de imersão numa solução de SBF. Para tal utilizou-se uma amostra com área de  $1,0 \pm 0,5\text{ cm}^2$  e espessura de  $0,025\text{ mm}$  e os resultados são relativos ao ciclo 8 de ensaio com um *Scan Rate* de  $80\text{ mV.s}^{-1}$ .

O voltamograma para a membrana de PCL imersa numa solução de SBF apresenta valores de corrente que atingem os  $6\mu\text{A}$ , cujo comportamento é típico de difusão de iões entre os eléctrodos. A imersão da membrana em SBF permite a incorporação de diversos iões e moléculas de água nas fibras. Embora não se presenciem picos redox pode-se afirmar que existe um fluxo de iões no interior da matriz polimérica, o que implica um aumento da densidade de corrente, quando comparado com uma membrana seca [9]. Por outro lado, deve também referir-se que estudos prévios revelaram que um aumento na espessura leva a um

aumento na área superficial e, consequentemente, a um aumento dos sítios activos que promovem a ocorrência de reacções redox, no entanto esses picos não existem, pelo menos com os parâmetros utilizados na VC, o que se pensa estar relacionado com a imersão de membrana em SBF.

Após electrodeposição de PPy verifica-se que houve um aumento significativo da corrente passando esta de valores na ordem dos  $\mu\text{A}$  para valores na ordem dos mA. Atendendo que o PPy é condutor, o resultado indica a presença deste polímero condutor nas fibras da matriz e neste caso há mesmo electrões a circularem através da membrana entre os dois eléctrodos. Os resultados mostram assim que a membrana com PPy pode funcionar como um eléctrodo a utilizar no biodispositivo.

Na figura 4.14 ilustram-se os voltamogramas obtidos para a membrana de PCL após electrodeposição de NPs de Ouro por Voltametria Cíclica, seguida de imersão numa solução de SBF. A diferença dos voltamogramas reside apenas no facto de se ter aplicado a um deles uma corrente de 2,5mA durante 2min. Utilizou-se uma amostra com área de  $1,0 \pm 0,5 \text{ cm}^2$  e espessura de 0,025mm e os resultados são relativos ao ciclo 8 de ensaio com um *Scan Rate* de  $80 \text{ mV.s}^{-1}$ .

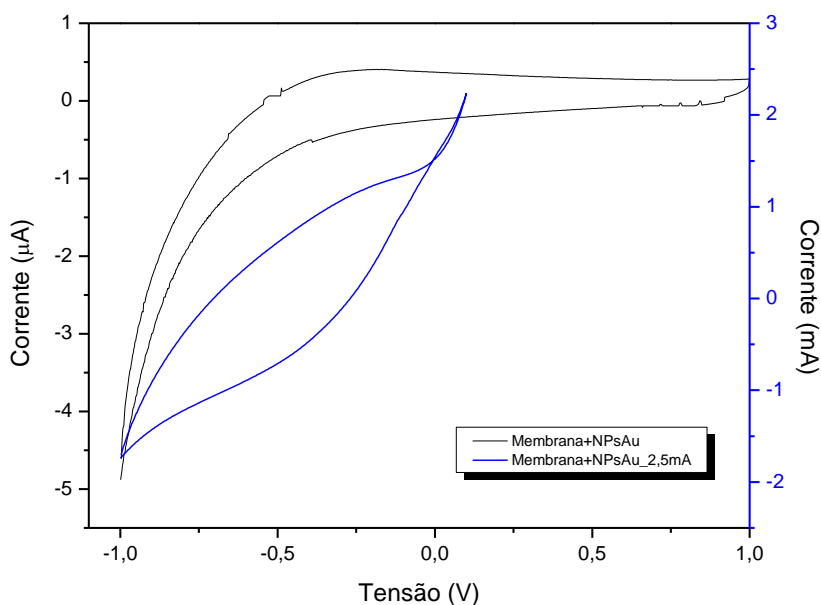
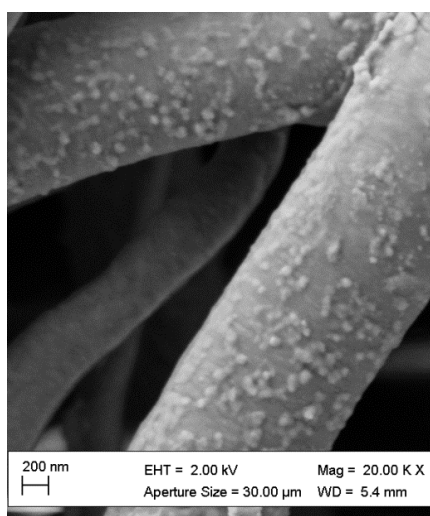


Figura 4.13 Voltamograma da membrana de PCL (espessura igual a 0,025mm e área de  $1 \pm 0,5 \text{ cm}^2$ ) após electrodeposição de NPs de Ouro e imersão numa solução de SBF; Voltamograma da membrana de PCL após aplicação de uma corrente de 2,5mA durante 2 minutos e posterior electrodeposição de NPs de Ouro seguida de imersão numa solução de SBF.



Através da análise da figura anterior (figura 4.14) é possível constatar que os valores de corrente para a membrana onde se aplicou uma corrente de 2,5mA durante 2 minutos são bastante superiores quando comparados com a corrente que atravessa a membrana onde apenas se procedeu à electrodeposição das NPs por Voltametria Cíclica. Este aumento de corrente indicia que após a aplicação de uma corrente contínua as nanopartículas se depositam mais facilmente na superfície das fibras da membrana tal como se pode observar na imagem SEM ilustrada de seguida (figura 4.15).



*Figura 4.14 Imagem SEM da membrana após aplicação de uma corrente de 2,5mA durante 2 minutos e posterior electrodeposição de NPs de Ouro por Voltametria Cíclica.*

Na figura 4.16 presenciam-se os voltamogramas obtidos para a membrana imersa numa solução de SBF e para a membrana após electrodeposição de NPs de Prata por Voltametria Cíclica, seguida também de imersão numa solução de SBF. Foi utilizada uma amostra com área de  $1,0 \pm 0,5 \text{ cm}^2$  e espessura de 0,025mm e os resultados são referentes ao ciclo 8 de ensaio com um *Scan Rate* de  $80 \text{ mV.s}^{-1}$ .

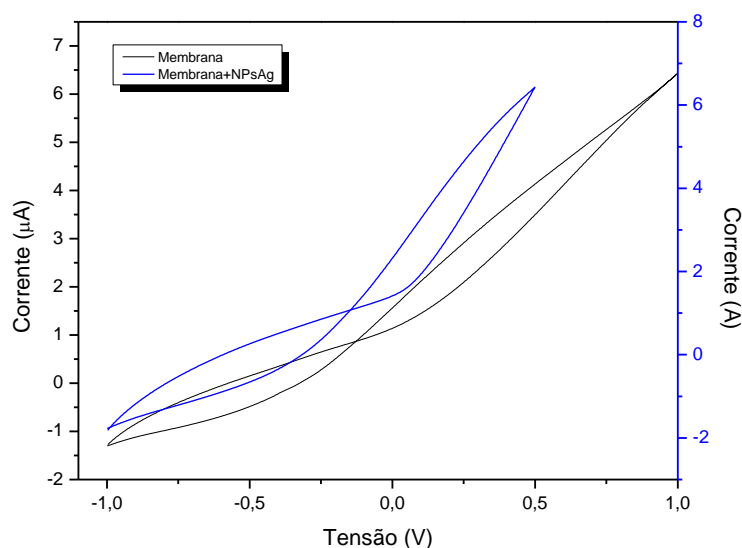


Figura 4.15 Voltamograma da membrana de PCL (espessura igual a 0,025mm e área de  $1\pm0,5\text{cm}^2$ ) imersa numa solução de SBF e da membrana de PCL após electrodeposição de NPs de Prata por Voltametria Cíclica, seguida de imersão numa solução de SBF.

Através da comparação dos valores de corrente entre a membrana de PCL e a membrana de PCL após electrodeposição de nanopartículas de Prata são evidentes as diferenças entre estes, uma vez que os valores relativos a esta última rondam os amperes o que é bastante promissor tendo em conta a espessura e a área destas membranas. Ou seja, a membrana com nanopartículas de Ag é bastante condutora devido à incorporação das nanopartículas. Contudo, através da imagem SEM seguinte (figura 4.17) nota-se que o tamanho destas é muito pequeno comparativamente com as nanopartículas de Ouro, o que leva a afirmar que provavelmente se encontram distribuídas mais uniformemente.

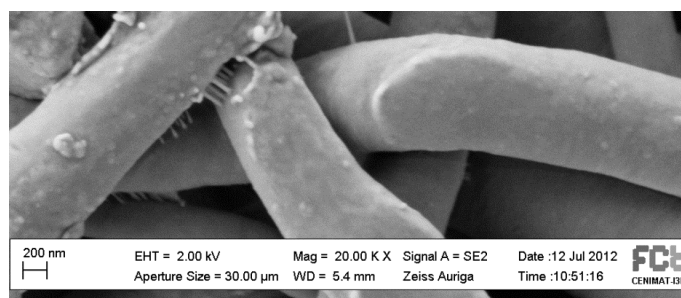


Figura 4.16 Imagem SEM da membrana após electrodeposição de NPs de Prata por Voltametria Cíclica, seguida de imersão numa solução de SBF.

- **Configuração com dois eléctrodos**

Na figura 4.18 observa-se o voltamograma obtido para a membrana imersa numa solução 0,9% (p/p) de NaCl, para o qual se utilizou uma amostra de área igual a  $1\text{ cm}^2$  e espessura de 0,050mm cujos resultados são referentes ao ciclo 3 de cada ensaio com um Scan Rate de  $80\text{mV.s}^{-1}$ .

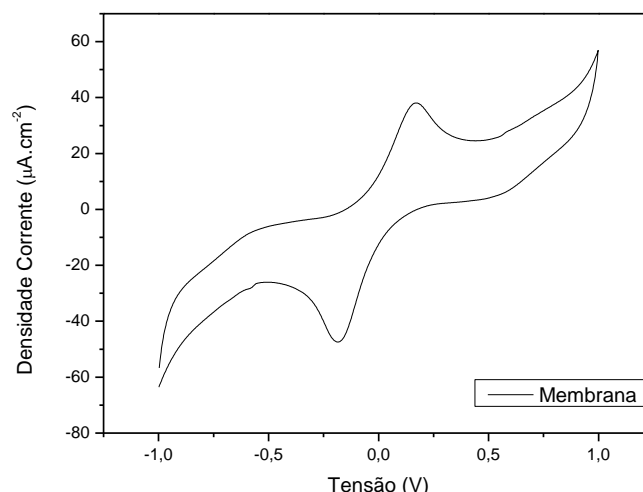


Figura 4.17 Voltamograma da membrana de PCL após imersão numa solução de 0,9% de NaCl.

Ao contrário do que se verificou para a configuração anterior, a configuração com dois eléctrodos permitiu a observação de reacções redox, devido sobretudo à maior espessura das membranas em análise e ao maior tempo de imersão na solução de NaCl [9]. Uma vez que se observam inflexões e picos anódicos e catódicos pode-se afirmar que este se trata de um processo reversível, onde se prevê que exista uma transferência de cargas entre a membrana e os eléctrodos [30].

Relativamente ao voltamograma das membranas de PCL funcionalizadas com nanopartículas de Ouro e Prata por intermédio de electrofiação aferiu-se que o comportamento das membranas foi muito similar aquele que se alcançou para a configuração com três eléctrodos, tal como seria expectável uma vez que sendo as membranas condutoras mesmo com a introdução de NaCl há uma corrente de electrões entre os dois terminais cujo valor é  $0,025\mu\text{A}$  para as nanopartículas de Ouro e de  $0,1\text{A}$  para as nanopartículas de prata (considerando uma tensão de  $0,3\text{V}$ ) para a membrana com NaCl (figura 4.19).

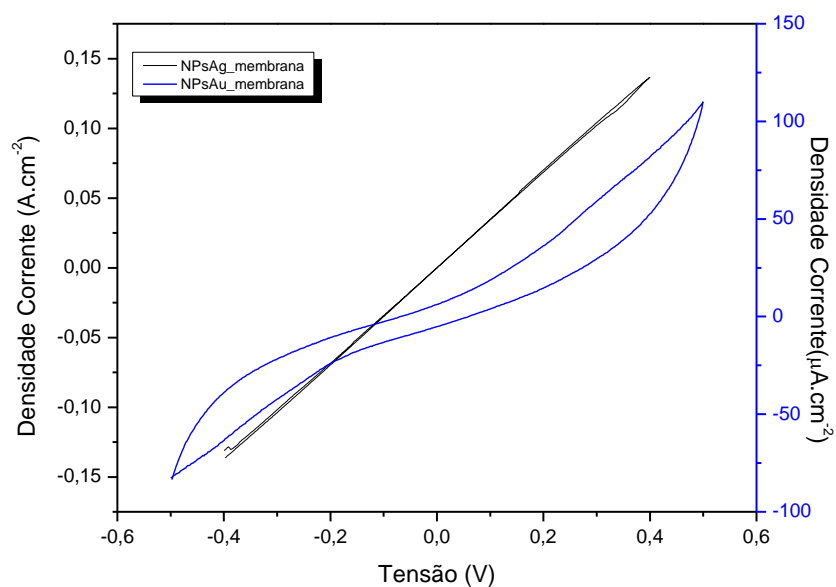


Figura 4.18 Voltamograma da membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro e Prata através de electrofiação, após imersão numa solução de 0,9% de NaCl.

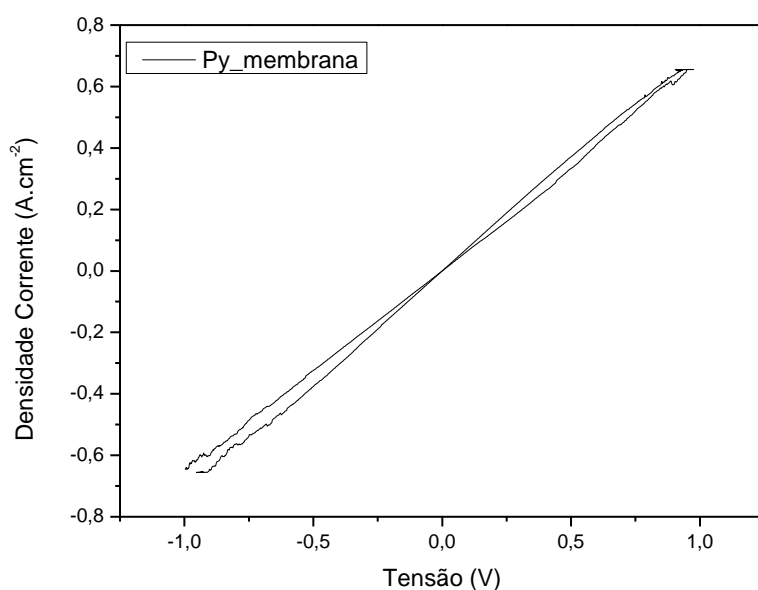


Figura 4.19 Voltamograma da membrana de PCL funcionalizada com Py através de electrofiação, após imersão numa solução de 0,9% de NaCl.

No que se refere à membrana de PCL funcionalizada com Py através de electrofiação verificou-se houve um aumento na densidade de corrente relativamente ao sistema de três eléctrodos,

o que pode ser justificado com o facto de poder existir uma eventual electropolimerização do Py que medeia a formação do PPy após a imersão da membrana na solução de NaCl.

#### 4.3.2.2 Condutividade Eléctrica

A condutividade superficial é uma propriedade eléctrica do material que se pode obter a partir de Curvas IV. Para tal colocou-se um pedaço da membrana entre dois eléctrodos de Al, tendo esta sido fixada por meio de cola de prata. Os gráficos relativos às curvas IV obtidas encontram-se em anexo (anexo 1) e os resultados obtidos estão indicados na tabela 4.6.

Tabela 4.6 Dados relativos ao cálculo da condutividade para as amostras em análise;

Amostra	Comprimento (m)	Largura (m)	Espessura (m)	1/R (S)	Condutividade (S <sup>-1</sup> .m <sup>-1</sup> )
PCL	8,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	3,0x10 <sup>-5</sup>	5,0x10 <sup>13</sup>	2,69x10 <sup>-9</sup>
PCL_NPsAu_electr	7,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	6,8x10 <sup>-6</sup>	3,3x10 <sup>12</sup>	1,54x10 <sup>-7</sup>
PCL_NPsAg_electr	7,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	7,0x10 <sup>-6</sup>	3,3x10 <sup>12</sup>	1,50x10 <sup>-7</sup>
PCL_Py_electr	8,0x10 <sup>-3</sup>	3,0x10 <sup>-3</sup>	5,0x10 <sup>-5</sup>	5,0x10 <sup>13</sup>	1,07x10 <sup>-9</sup>
PCL_NPsAg_VC	8,0x10 <sup>-3</sup>	2,0x10 <sup>-3</sup>	5,0x10 <sup>-5</sup>	5,0x10 <sup>13</sup>	1,60x10 <sup>-9</sup>
PCL_NPsAu_VC	8,0x10 <sup>-3</sup>	4,0x10 <sup>-3</sup>	5,0x10 <sup>-5</sup>	3,3x10 <sup>13</sup>	1,20x10 <sup>-9</sup>
PCL_PPy_VC	8,0x10 <sup>-3</sup>	4,0x10 <sup>-3</sup>	5,0x10 <sup>-5</sup>	3,3x10 <sup>13</sup>	1,20x10 <sup>-9</sup>

Em termos de condutividade superficial verifica-se que a condutividade da membrana de PCL sem e com Nps ou PPy não é significativamente alterada, talvez porque pode não haver uma deposição contínua quer das NPs quer do PPy ao longo das fibras. As membranas funcionalizadas com nanopartículas através de electrofiação apresentaram maior condutividade relativamente à membrana de PCL o que indica uma melhor distribuição destas ao longo das fibras da membrana. Tal no entanto não se verifica para o caso do Py, provavelmente porque este não se encontra polimerizado. Uma distribuição não uniforme de NPs ou PPy é crítica na condutividade ao longo das fibras visto que os electrões não conseguem encontrar um percurso por onde possam circular.

## 4.4. Caracterização do dispositivo electroquímico

### 4.4.1. Propriedades Electroquímicas

As propriedades electroquímicas da membrana e dos diferentes eléctrodos, foram analisadas através de voltametria cíclica. Neste dispositivo, o cátodo é formado pelo material que sofre redução (receptor de electrões) e o ânodo pelo material que se oxida (doador de electrões). Os dispositivos testados foram imersos durante alguns segundos numa solução de NaCl 0,9% (p/p) e posteriormente colocados entre os contactos de ouro. De seguida, estes foram colocados na célula electroquímica ilustrada na figura 3.4. É de salientar que as duas estruturas analisadas resultam da combinação dos eléctrodos que mostraram melhor condutividade individualmente para cada uma das diferentes funcionalizações.

#### 4.4.1.1 NPsAu (cátodo) /Membrana/ PPy (ânodo)

A primeira estrutura analisada possui ambos os eléctrodos funcionalizados por electrodeposição através de Voltametria Cíclica. O eléctrodo de referência trata-se da membrana funcionalizada com nanopartículas de Ouro após adição de uma corrente de 2,5mA e o de trabalho da membrana funcionalizada com PPy. O voltamograma desta estrutura encontra-se ilustrado na figura 4.21.

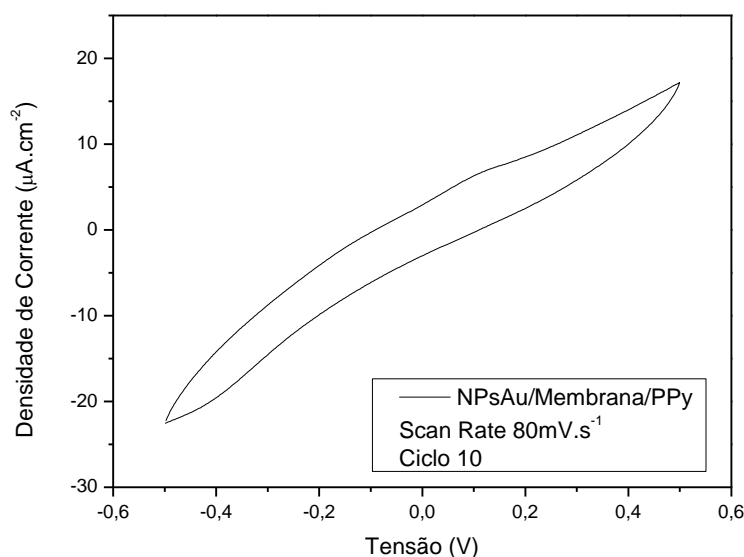


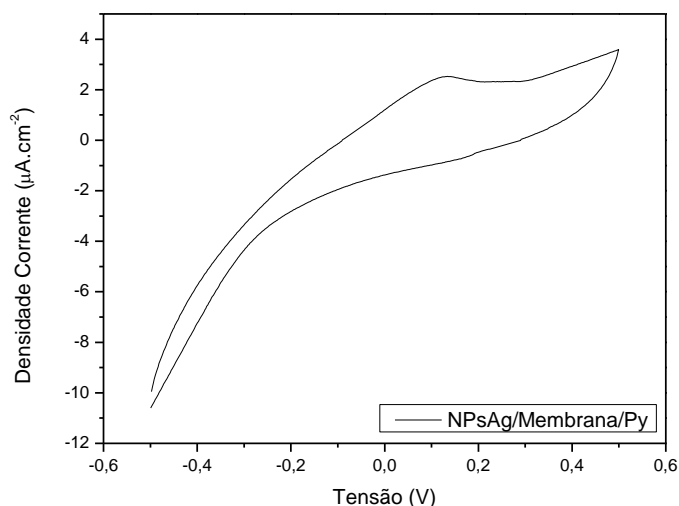
Figura 4.20 Voltamograma do Ciclo 10 obtido para o dispositivo NPsAu/Membrana/PPy para um Scan Rate de 80mV.s<sup>-1</sup>.

O voltamograma mostra que existe uma diminuição da densidade de corrente quando são depositados os eléctrodos comparativamente com os valores que se obtiveram para cada um destes separadamente, o que seria de esperar devido à membrana de PCL que impede a passagem dos electrões. No entanto, não se observam picos reveladores da existência de reacções redox, existindo apenas um mecanismo de difusão de iões.

Os valores de densidade de corrente de curto-circuito são da ordem dos  $15\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$ .

### 4.4.1.2 NPsAg (cátodo) /Membrana/ Py (ânodo)

A segunda estrutura em estudo possui ambos os eléctrodos funcionalizados através da técnica de electrofiação. O eléctrodo de referência é a membrana funcionalizada com nanopartículas de Prata e o de trabalho é a membrana funcionalizada com Py. O voltamograma desta estrutura encontra-se ilustrado na figura 4.22.



*Figura 4.21 Voltamograma do Ciclo 7 obtido para o dispositivo NPsAg/Membrana/Py para um Scan Rate de  $80\text{mV}.\text{s}^{-1}$ .*

Na figura 4.22 observa-se no sentido inverso do varrimento de potencial um pico anódico a 0,1 V e uma inflexão a 0,2V, o que mostra que se o tempo de imersão da membrana em NaCl tivesse sido maior poderiam observar-se reacções redox acompanhadas dos picos anódicos e catódicos e respectivas inflexões.

Embora apenas se encontre aqui ilustrado um ciclo deste ensaio foi visível a estabilidade electroquímica desta estrutura assim como a reprodutibilidade dos ciclos.

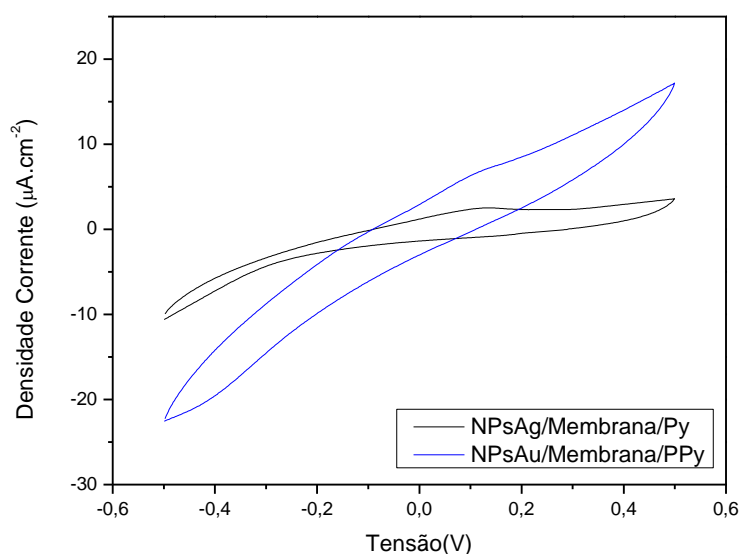


Figura 4.22 Voltamograma para as duas estruturas analisadas com um Scan Rate de  $80\text{mV.s}^{-1}$ ;

Os valores de densidade de corrente mais elevados dizem respeito à estrutura cujos eléctrodos foram funcionalizados através de Voltametria Cíclica. A potência máxima desta estrutura foi determinada tal como a tensão e corrente associadas (figura 4.24). A uma densidade de potência máxima a  $0,11\mu\text{W.cm}^{-2}$  corresponde uma tensão igual a  $0,15\text{V}$  e corrente  $1,35\mu\text{A}$  para um dispositivo com  $1\text{ cm}^2$  de área.

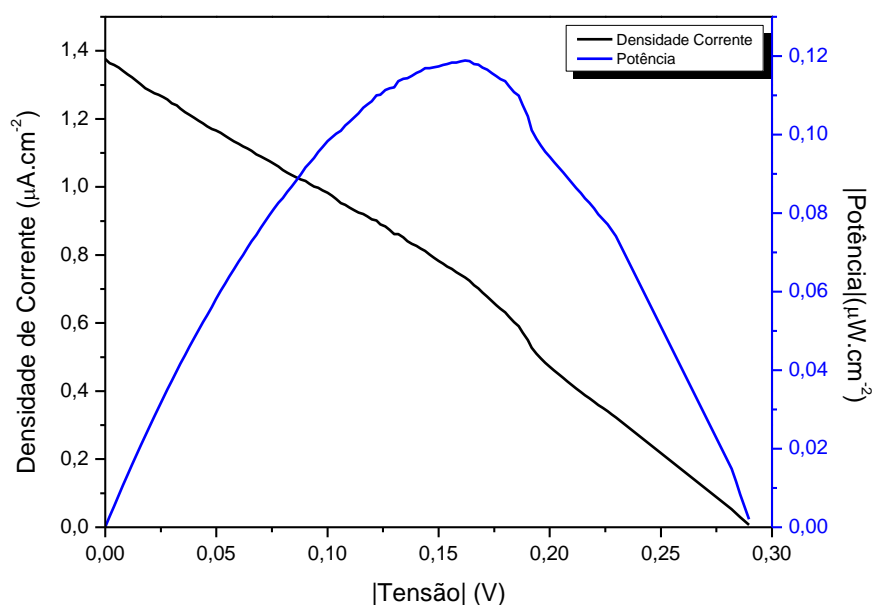


Figura 4.23 Gráfico da densidade de Potência e de corrente em função da tensão para dispositivo NPsAu/Membrana 0,050mm/PPy.



## 4.5. Desenvolvimento de um Protótipo

Um protótipo de um possível biodispositivo electroquímico construído pela membrana de PCL, com uma espessura de 0,050mm e dimensões de 1 cm x 1 cm aproximadamente, foi testado em termos eléctricos após imersão em soro fisiológico. As membranas que servirão como eléctrodos foram funcionalizadas por electrofiação e por voltametria cíclica e posteriormente depositadas em cada uma das faces da membrana de PCL.

As medições de tensão de circuito aberto e corrente de curto-circuito foram realizadas com um multímetro, colocando cada terminal do multímetro em contacto com os eléctrodos do dispositivo através de fios de carbono. Foram obtidos valores de tensão e densidade de corrente de curto-circuito respectivamente de 0,5 V e  $40\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  para a estrutura de NPsAu/Membrana 0,050mm/PPy (funcionalizada por Voltametria Cíclica) e de 0,4V e  $30\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  para a estrutura NPsAg/Membrana/Py (funcionalizada por electrofiação).



Figura 4.24 Fotografia do protótipo realizado: colocação do terminal do multímetro sobre os eléctrodos do dispositivo através de fios de carbono.



Figura 4.25 Fotografia da medição do valor de tensão (V) do dispositivo, NPsAu/Membrana 0,050mm/PPy após adição de soro fisiológico.

## Capítulo 5. Conclusões e perspectivas futuras

Os objectivos propostos para este trabalho foram alcançados.

A primeira parte da investigação incidiu sobre a degradação das membranas de PCL em PBS, onde se registou uma perda de massa de 9,33% relativamente à massa inicial, após 8 semanas de permanência da membrana de PCL naquele meio e após 10 semanas uma perda de 10,11%. Desta forma verificou-se que o PCL, durante o processo de degradação, sofreu erosão volumica uma vez que a perda de material só se verificou a partir da 8ª semana. Esta constatação foi também corroborada através das imagens SEM obtidas para as membranas uma vez que não se verificou a presença de quaisquer adulterações na superfície das fibras assim como alterações visuais nas dimensões exteriores e superfície das amostras.

Os ensaios de DSC realizados permitiram verificar que as amostras de PCL registaram um aumento na temperatura e entalpia de fusão após várias semanas de degradação levando a um aumento da sua cristalinidade, devido a um possível ataque hidrolítico dentro das regiões amorfas do polímero, e consequente rearranjo de cadeias de forma a criar uma estrutura mais ordenada.

As propriedades mecânicas das membranas, avaliadas através de ensaios de tracção, antes e depois do estudo da biodegradabilidade, permitiram determinar valores na ordem dos 9MPa para o módulo de Young, os quais coincidem com os valores típicos para o módulo de Young da pele uma vez que se pretende que o biodispositivo seja implantado subcutaneamente. Após biodegradação registou-se um ligeiro aumento pouco significativo da rigidez do material devido provavelmente ao aumento do grau de cristalinidade das amostras.

Relativamente ao estudo dos eléctrodos condutores, as membranas de PCL foram funcionalizadas com nanopartículas de Ouro, Prata e Polipirrole. A funcionalização consistiu na introdução das nanopartículas ou polipirrol na matriz polimérica das fibras. Esta foi realizada por electrofiação da solução de PCL com nanopartículas ou através de electrodeposição das nanopartículas ou polipirrol na superfície das fibras.

As duas estruturas formadas por intermédio de cada uma das funcionalizações, NPsAu/Membrana/PPy e NpsAg/Membrana/Py, foram utilizadas na realização de protótipos. Nestes a membrana de PCL tinha uma espessura de 0,050mm e dimensões de 1x1cm, aproximadamente. Foram obtidos valores de tensão de circuito aberto e densidade de

corrente de curto-circuito, respectivamente de 0,5 V e  $40\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  para a primeira estrutura e de 0,4V e  $30\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  para a segunda estrutura analisada.

Os resultados de voltametria cíclica obtidos para estas estruturas não revelaram a existência de reacções redox, indicando que o processo é dominado pela difusão dos iões entre os dois eléctrodos.

Como resumo final é de salientar que, tal como se pretendia, o estudo da degradabilidade do PCL em meios que simulam fluidos biológicos fica definido, tendo sido possível correlacionar a sua degradação com as propriedades tanto ao nível estrutural e mecânico como ao nível electroquímico.

No entanto, como perspectivas futuras é ainda necessário aprofundar o estudo dos eléctrodos, principalmente ao nível da funcionalização das membranas através de procedimentos que garantam uma maior deposição das nanopartículas sobre as fibras quer por electrofiação ou electrodeposição. Outro dos testes relevantes a fazer prende-se com a condutividade transversal das membranas com a obtenção de curvas IV após o processo de voltametria cíclica. Por outro lado deve-se também explorar outras alternativas como por exemplo a introdução de diferentes polímeros condutores como o politiofeno ou a polianilina.

No sentido de definir a biocompatibilidade de todos os materiais utilizados deverá proceder-se à realização de testes de citotoxicidade para cada uma das membranas de PCL funcionalizadas, de forma a que os dispositivos possam ser aplicados a nível biomédico.

Definidos os critérios de biocompatibilidade e biodegradação assim como os requisitos energéticos, estes dispositivos revelam grandes potencialidades ao nível dos dispositivos médicos electrónicos de baixo consumo cujas aplicações se centram essencialmente no diagnóstico, monitorização e tratamento.

## Referências Bibliográficas

- [1] Arun Patil et al., **Review: Issue and challenges facing rechargeable thin film lithium batteries**, *Materials Research Bulletin*, 43 (2008), 1913–1942.
- [2] Hansen, B., Liu, Y., Yang, R., et al., **Hybrid Nanogenerator for Concurrently Harvesting Biomechanical and Biochemical Energy**. *ACSNano*, 4(7) (2010), 3647–3652.
- [3] Arun Patil et al., **Review: Issue and challenges facing rechargeable thin film lithium batteries**, *Materials Research Bulletin*, 43 (2008), 1913–1942.
- [4] James Larminie, **Fuel Cell Systems Explained**, Second Edition, Wiley (2003).
- [5] S. Kerzenmacher, **Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells**, *Journal of Power Sources*, 182 (2008), 1–17.
- [6] Ki Bang Lee et al., **Urine-activated paper batteries for biosystems**, *J. Micromech. Microeng.*, 15 (2005), S210–S214.
- [7] Pushparaj et al., **Flexible energy storage devices based on nanocomposite paper** *PNAS*, 104, 34 (2007), 13574-13577.
- [8] Baptista, A.C., **Produção de biobaterias a partir de membranas obtidas pela técnica de electrofiação**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, FCT-UNL, (2009).
- [9] Neto, J.S., **Produção e caracterização de biobaterias a partir de matrizes de nanofibras**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, FCT-UNL, (2010).
- [10] Morrison, R., R. Boyd, **Macromoléculas. Polímeros e Polimerização**, in *Química Orgânica*, F.C. Gulbenkian, Editor. (1996), Lisboa. p. 1207-1237.
- [11] Fambri, L., et al., **Biodegradable Polymers**, in *Integrated Biomaterials Science*, R. Barbucci, Editor. (2002), Kluwer Academic Publishers Siena. p. 119-187.

- [12] Bourzac, K., **Dissolvable devices make better medical implants**. Technology Review, 113 (3), 58-59. (2010). Acedido a 3 Outubro de 2012, no Web site: <http://www.technologyreview.com/biomedicine/25086/>.
- [13] Marianne Labet, Wim Thielemans, **Synthesis of Polycaprolactone: a review**, Chemical Society Reviews, (2009), Vol. 38, pp. 3484-3504.
- [14] Teo, W. E., Ramakrishna, S., **A review on electrospinning design and nanofibre assemblies**, Nanotechnology, 17 (2006), R89–R106.
- [15] Pham, Q. P., Sharma, U., Mikos, A. G., **Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review**. Tissue Engineering, (2006), 12 (5).
- [16] Dan Li, Younan Xia. **Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?** Advanced Materials, (2004), Vol. 16 no.14.
- [17] Andreas Greiner, Joachim H. Wendorff, **Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers**. Angewandte Chemie, (2007), Vol. 46.
- [18] Reza Ansari., **Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies**, Guilan University, Rasht, Iran, (2006).
- [19] Gerard M., Chaubey A., Malhotra B., **Application of conducting polymers to biosensors**, Biosensors & Bioelectronics 17 (2002) 345–359.
- [20] Sironmani A., Daniel K., **Silver Nanoparticles – Universal Multifunctional Nanoparticles for BioSensing, Imaging for Diagnostics and Targeted Drug Delivery for Therapeutic Applications**, Drug Discovery and Development - Present and Future, ISBN: 978-953-307-615-7. Acedido a 3 Outubro de 2012, no Web site: <http://www.intechopen.com/books/>
- [21] Ahmad A, Ramakrishnan A, McLean MA, Breau AP., **Use of surface plasmon resonance biosensor technology as a possible alternative to detect differences in binding of enantiomeric drug compounds to immobilized albumins**, Biosensors and Bioelectronics, (2003) Apr;18(4):399-404.

- [22] Shipway, A.N., E.Katz, and I. Willner, **Nanoparticles arrays on surfaces for electronic, optical and sensor applications**. Chemphyschem, 2000.1(1): p.18-52.
- [23] Clemens van Blitterswijk, **Tissue Engineering**, 1ª edição, Elsevier Inc., (2008).
- [24] Egerton, R. F., **Physical Principles of Electron Microscopy: An introduction to TEM, SEM and AEM**, Springer Science (2005), United States of America. Acedido a 3 Outubro de 2012, no Web site: <http://pt.scribd.com/doc/8288963/Physical-Principles-of-Electron-Microscopy-an-Introduction-to-TEM-SEM-and-AEM>.
- [25] Casimiro, M.H. et al, **Análise Calorimétrica aplicada a Polímeros Biológicos**, Parte I: Fundamentos Teóricos. Acedido a 3 Outubro de 2012, no Web site: [http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ\\_098\\_029\\_09.pdf](http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_098_029_09.pdf).
- [26] Becker, H., **Organikum – Química Orgânica Experimental**, 2ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian (1997), Lisboa.
- [27] Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Morrill, T. C., **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5ª ed., LTC.
- [28] Vinadé, Maria Elisabeth do Canto; Vinadé, Elsa Regina do Canto, **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**, editora UFSM.
- [29] Monk, P., **Fundamentals of Electro- Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons Ltd (2001), United Kingdom.
- [30] Wang, J., **Analytical Electrochemistry**, 2nd edition, Wiley- VC, (2000), United States of America.
- [31] Jalota, S., Bhaduri, S., Tas, A., **Effect of carbonate content and buffer type on calcium phosphate formation in SBF solutions**, J Mater Sci: Mater Med (2006) 17:697–707.
- [32] Muller L., Muller Frank A., **Preparation of SBF with different  $\text{HCO}_3^-$  content and its influence on the composition of biomimetic apatites**, Acta Biomaterialia 2 (2006) 181–189.

- [33] Tavares, V.A., **Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos**, Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, FCT-UNL, (2011).
- [34] A.D. McFarland, C.L. Haynes, C.A. Mirkin, R.P.V. Duyne, and H.A. Godwin, **Journal of Chemical Education**, (2004), Vol. 81, 544A-544B.
- [35] S.D. Solomon, M. Bahadory, A.V. Jeyarajasingam, S.A. Rutkowsky, and C. Boritz, **Journal of Chemical Education**, (2007), Vol. 84, 322-325.
- [36] C.M. Li, C.Q. Sun, W. Chen, L. Pan, **Electrochemical thin film deposition of PPy on different substrats**, Surface and Coatings Technology, (2005), 198:474.
- [37] Bolgen, N. et al., **In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions**, J. Biomater. Sci. Polymer, (2005), 16(12), 1537-1555.
- [38] F.M. Hendriks et al., **Mechanical Properties of Different Layers of Human Skin**, Faculty of Mechanical Engineering, Dept. of Materials Technology, P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven, the Netherlands.
- [39] P. G. Agache, C. Monneur, J. L. Leveque and J. De Rigal, **Mechanical Properties and Young's Modulus of Human Skin in Vivo**, Arch Dermatol Res 269, 221-232 (1980).
- [40] A. Ní Annaidh et al., **Mechanical Properties of Excised Human Skin**, School of Human Kinetics, University of Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada.

## Capítulo 6. Anexos

### Anexo 1 Curvas I-V

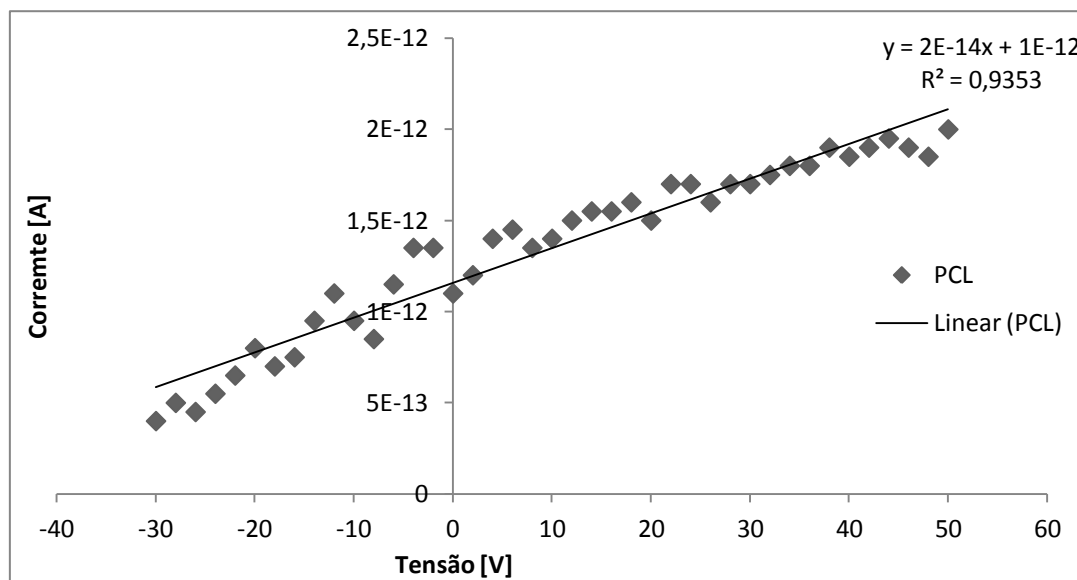


Figura 6.1 Curva I-V relativa a uma membrana apenas de PCL.

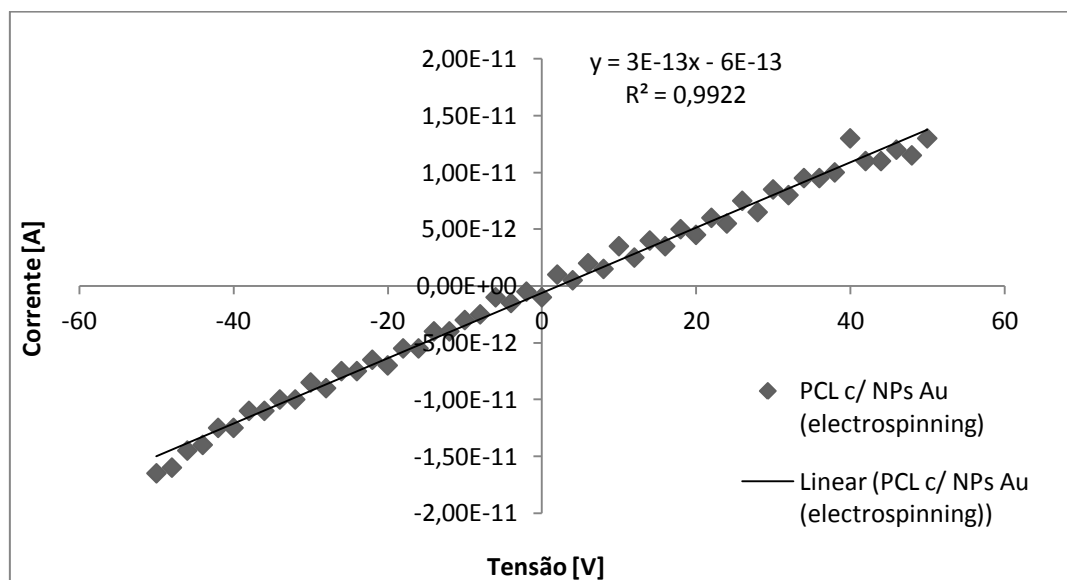


Figura 6.2 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro por intermédio da técnica de electrospinning.



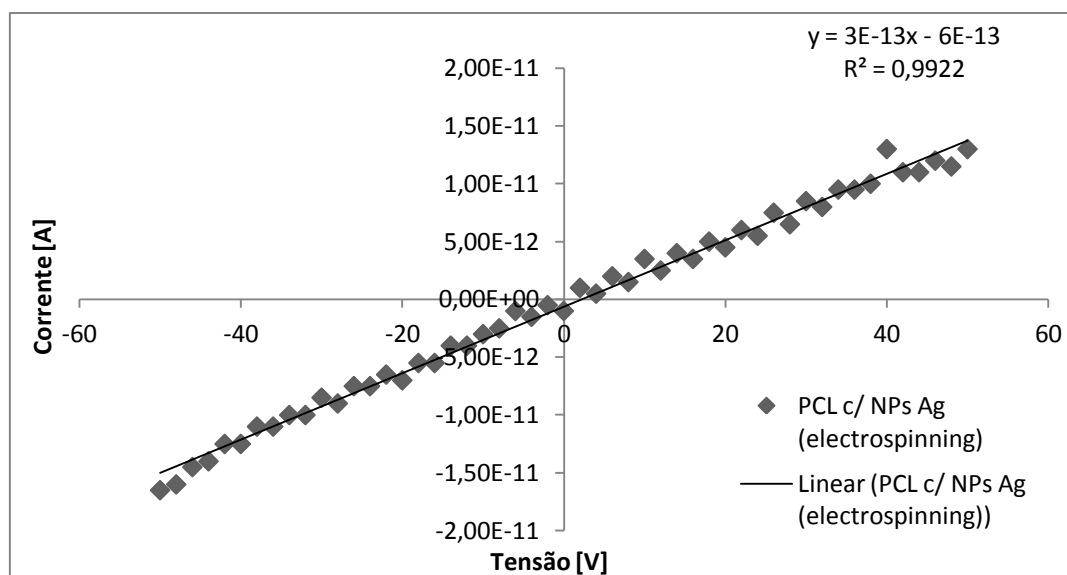


Figura 6.3 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Prata por intermédio da técnica de electrospinning.

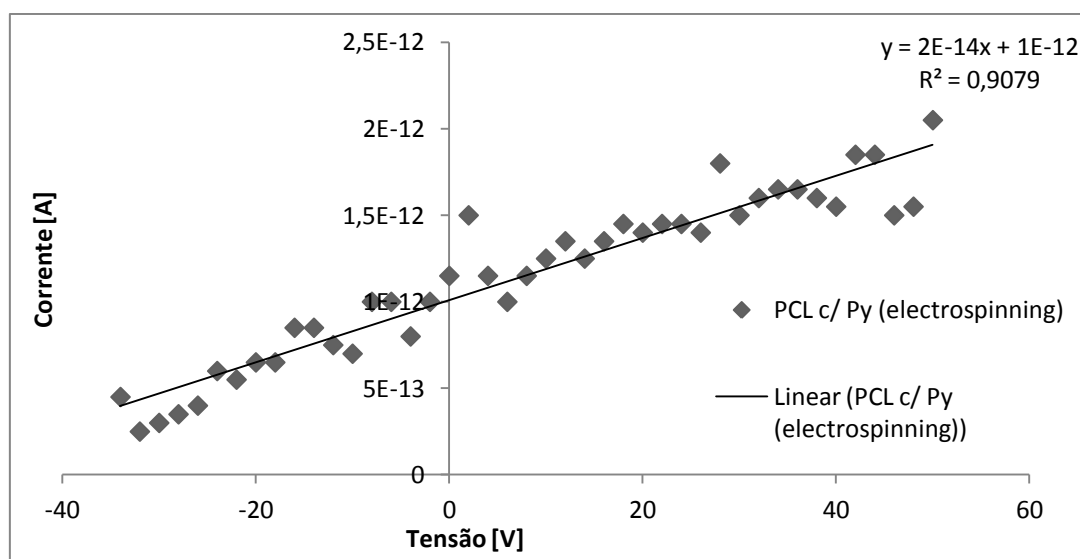


Figura 6.4 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com Py por intermédio da técnica de electrospinning;

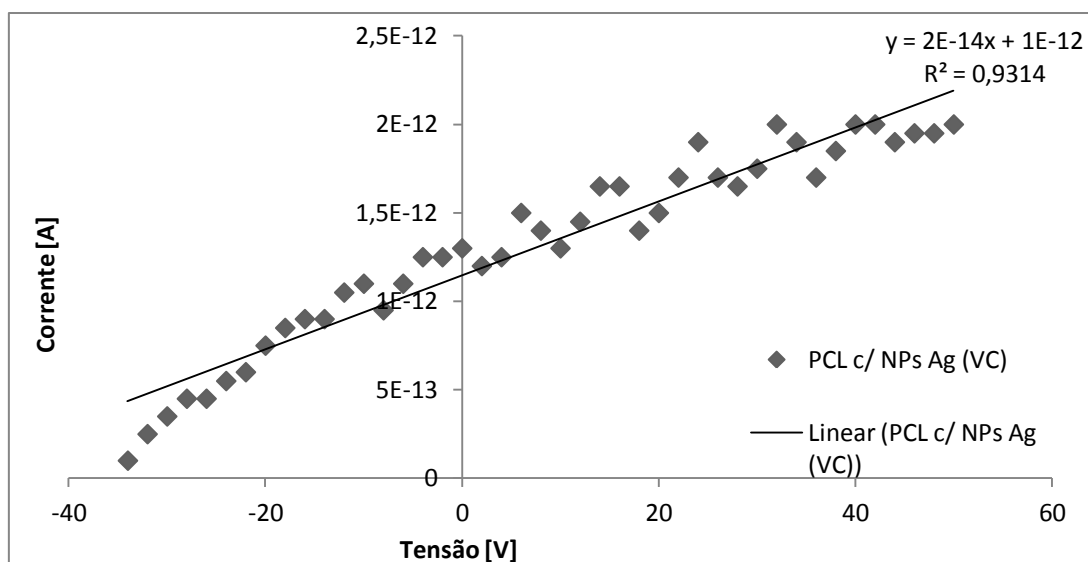


Figura 6.5 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Prata através de electrodeposição por VC.

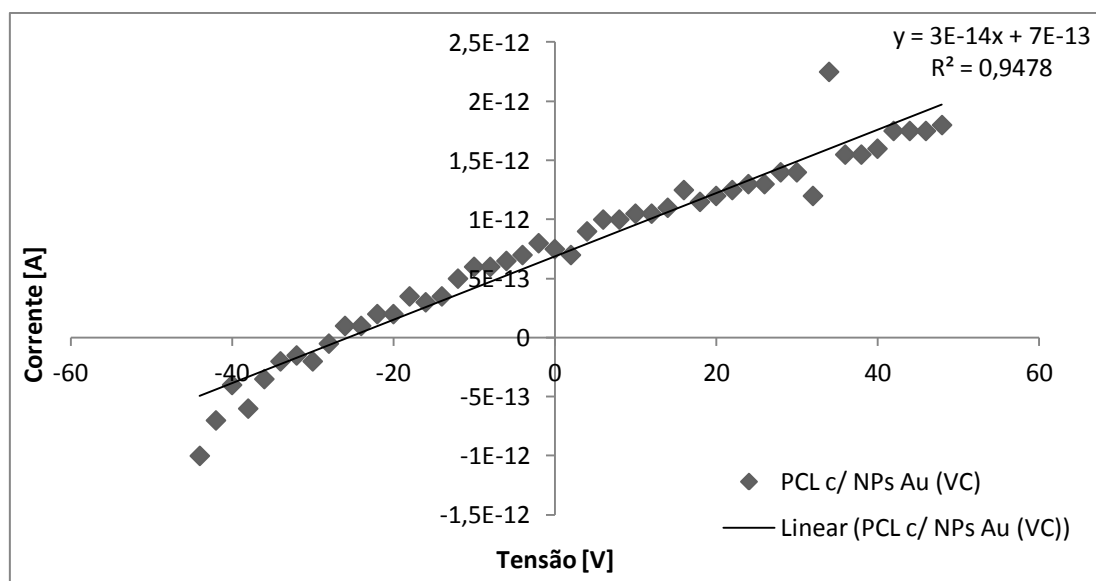


Figura 6.6 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com NPs de Ouro através de electrodeposição por VC.

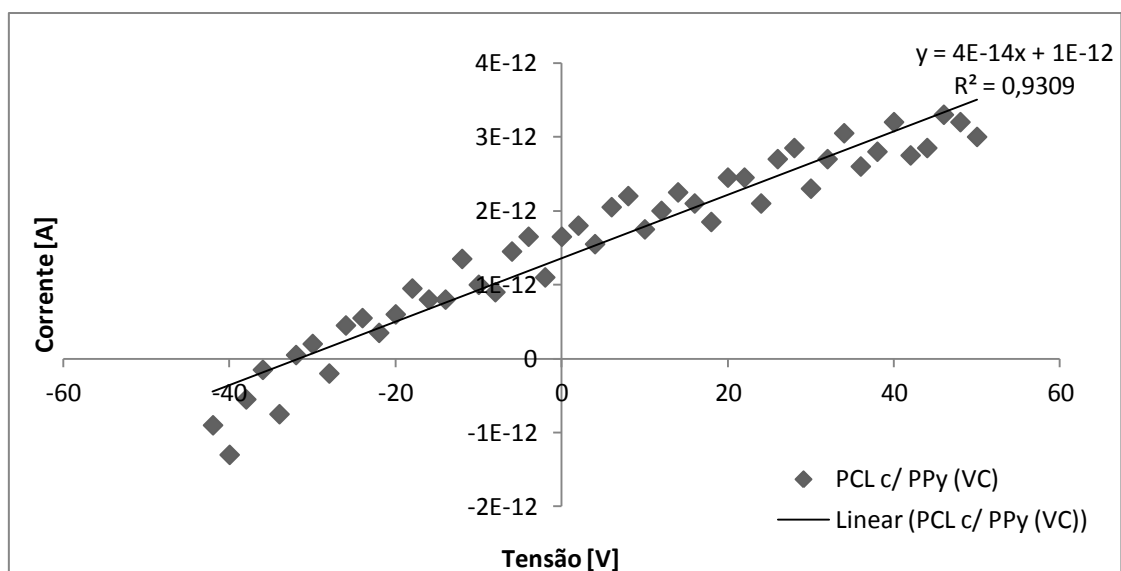


Figura 6.7 Curva I-V relativa uma membrana de PCL funcionalizada com PPy através de electrodeposição por VC.